UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1948-1949 — N° 25

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES MÉTHODES CHIMIQUES DE DOSAGE DES ŒSTROGÈNES NATURELS

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE
(Professeur agrégé F. TAYEAU)

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement le Lundi 6 Décembre 1948

PAR

Jean-Luc-François JAUBERT

ANCIEN EXTERNE DES HÔPITAUX
DIPLÔMÉ DE MÉDECINE DU TRAVAIL

Né à Bordeaux (Gironde), le 29 Juin 1921

Examinateurs de la Thèse	MM. RIVIÈRE, professeur	*Président*
	PIÉCHAUD, professeur	*Juges*
	TAYEAU, agrégé	
	MAYER, agrégé	

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE

1948

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1948-1949 — N° 25

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES MÉTHODES CHIMIQUES DE DOSAGE DES ŒSTROGÈNES NATURELS

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE
(Professeur agrégé F. TAYEAU)

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement le Lundi 6 Décembre 1948

PAR

Jean-Luc-François JAUBERT

ANCIEN EXTERNE DES HÔPITAUX
DIPLÔMÉ DE MÉDECINE DU TRAVAIL

Né à Bordeaux (Gironde), le 29 Juin 1921

Examinateurs de la Thèse :

MM. RIVIÈRE, professeur ..... *Président*
PIÉCHAUD, professeur .....
TAYEAU, agrégé ..... *Juges*
MAYER, agrégé .....

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE

1948

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYEN : M. DUPÉRIÉ — ASSESSEUR : M. CHELLE

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. DENIGÈS, A. MANDOUL, PETGES, GUYOT, ANDÉRODIAS, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES, LEURET, PÉRY, LABAT, CHARRIER.

PROFESSEURS :

	MM.
Clinique médicale	DUPÉRIÉ / CREYX
Clinique chirurgicale et gynécologique	MASSÉ
Clinique chirurgicale	PAPIN
Clinique d'accouchements	RIVIÈRE
Anatomie pathologique et microscopie clinique	DE GRAILLY
Anatomie	VILLEMIN
Anatomie générale et histologie	G. DUBREUIL
Hygiène et tuberculose	PIÉCHAUD
Médecine légale et médecine du travail	DERVILLÉE
Electroradiologie et clinique d'électricité médicale	REBOUL
Chimie	CHELLE
Botanique et matière médicale	GOLSE
Pharmacie	VITTE
Physiologie	FABRE
Clinique médicale des maladies des enfants	FONTAN

	MM.
Zoologie et parasitologie	SIGALAS
Médecine expérimentale	AUBERTIN
Clinique ophtalmologique	BEAUVIEUX
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	LOUBAT
Clinique des maladies infectieuses	DAMADE
Chimie biologique et médicale	MACHEBŒUF
Physique médicale et pharmaceutique	PIFFAULT
Médecine coloniale et Clinique des maladies exotiques	BONNIN
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JOULIA
Clinique des maladies des voies urinaires	DARGET
Clinique des maladies nerveuses et mentales	DELMAS-MARSALET
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN
Toxicologie et hygiène appliquée	CASTAGNOU
Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ

PROFESSEUR A TITRE PERSONNEL : M. GIRARD.

PROFESSEURS SANS CHAIRE : MM. PERRENS (Maladies mentales), DUFOUR (Anatomie), MESNARD (Pharmacie).

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.
Physiologie	N...
Médecine générale	BROUSTET, SARIC, DUBARRY, J. TRAISSAC, BERGOUIGNAN
Chirurgie générale	N..., MAGENDIE, POUYANNE, LAUMONIER, CHAVANNAZ

	MM
Obstétrique	MAHON
Ophtalmologie	BESSIÈRE
Oto-rhino-laryngologie	DESPONS
Dermatologie et syphiligraphie	LE COULANT
Chimie médicale	TAYEAU
Chimie générale pharmaceut. et toxicologie.	N...
Histoire naturelle médicale et parasitologie.	N...
Histologie	MAYER
Pédiatrie et puériculture	VERGER
Médecine légale et médecine du travail	L'ÉPÉE
Electro-radiologie	LACHAPÈLE
Odonto-stomatologie	MARONNEAUD

MAITRE DE CONFÉRENCES :

Physique pharmaceutique ..... M. BLANQUET.

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.
Médecine opératoire	N...
Accouchements	N...
Puériculture	PÉRY
Zoologie et parasitologie	N...
Urologie	N...
Législation pharmaceutique	POPLAWSKI
Ophtalmologie	N...
Anatomie	RIGAUD
Chimie minérale	N...

	MM.
Botanique	GIRARD
Cryptogamie	GIRARD
Pharmacie galénique	MESNARD
Bactériologie	MOUREAU
Physiologie	Mlle ROUGIER
Chimie biologique	NEUZIL
Parasitologie et biologie appliquées	PAUTRIZEL
Pathologie chirurgicale	LAUMONIER

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. GERY. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MES ENFANTS

HÉLÈNE, FRANÇOIS, CATHERINE

A NOS JUGES :

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ G. MAYER

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ F. TAYEAU

CHARGÉ DE LA CHAIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE

DOCTEUR ÈS SCIENCES

MONSIEUR LE PROFESSEUR F. PIÉCHAUD

PROFESSEUR D'HYGIÈNE ET DE LA TUBERCULOSE

MÉDECIN DES HÔPITAUX

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

CROIX DE GUERRE

MÉDAILLE DES ÉPIDÉMIES

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR M. RIVIÈRE

PROFESSEUR DE CLINIQUE D'ACCOUCHEMENTS

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

CROIX DE GUERRE

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

AVANT-PROPOS

Ce travail nous a été inspiré par le M. Professeur Rivière qui, pendant deux ans, par l'intérêt qu'il y portait, nous a paternellement soutenu.

M. le Professeur agrégé F. Tayeau l'a rendu possible en nous accueillant dans son laboratoire et en nous fournissant les conseils, les moyens et les aides pour le poursuivre.

M. le Professeur agrégé Mayer ne nous a ménagé ni les encouragements ni les ressources de sa bibliographie.

Nous avons toujours trouvé, près du Docteur Servantie, du Docteur Moureau et du Docteur Blanquet, l'aide que nous sollicitions.

Qu'aurions-nous fait, enfin, sans nos amis du Laboratoire de chimie biologique, sans l'aide de J. Masquelier, de M^lle^ Minoux et de M^me^ Pons ? Nous sommes particulièrement redevable à cette dernière de l'aide si compétente qu'elle nous a fourni tout au long de ce travail.

***

Il nous plaît également d'associer à cet hommage de reconnaissance ceux parmi nos Maîtres qui ont le plus contribué à notre formation médicale.

Nous sommes heureux en particulier de remercier M. le Professeur Piéchaud, dont la sollicitude et la bienveillance à notre égard nous ont toujours été particulièrement précieuses. Aussi, sommes-nous heureux de lui dédier ce modeste travail, en témoignage de notre vive reconnaissance.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES MÉTHODES CHIMIQUES DE DOSAGE DES ŒSTROGÈNES NATURELS

INTRODUCTION

Dès nos premiers pas dans le domaine de l'obstétrique, nous avons compris que l'hormonologie promettait à cette discipline des enrichissements immenses, la compréhension de phénomènes jusque là obscurs, des thérapeutiques nouvelles...

L'obstétrique connut d'abord l'ère « mécanique », pendant laquelle furent étudiés le mécanisme de l'accouchement, ses anomalies et les manœuvres propres à y porter remède, puis vint l'ère bactériologique qui permit de comprendre et de traiter les maladies infectieuses de la grossesse et autorisa les manœuvres dites par « voie haute »; actuellement commence l'ère hormonale.

Trois grands types d'hormones sont reconnus comme particulièrement importants dans la gestation : le principe gonadotrope, le principe œstrogène et l'hormone progestative.

Nous nous sommes vite aperçu que l'étude de ces hormones était gravement entravée par l'absence d'une méthode de dosage vraiment pratique à la portée des laboratoires ordinaires et des bourses moyennes.

A l'heure actuelle, une telle méthode n'existe pas dans le domaine des œstrogènes auquel nous nous sommes particulièrement intéressé, et le clinicien se trouve réduit à

observer la réponse des récepteurs lorsqu'il veut suivre l'effet d'un traitement par les œstrogènes; situation analogue à celle du médecin qui conduirait le traitement d'un diabète par la diminution de la diurèse, de la polyphagie, de l'embonpoint ou de la maigreur, ou par les sensations de ses papilles linguales.

Nous insistons sur ce point que le clinicien n'a pas tant besoin d'une méthode rigoureusement exacte que d'une technique simple, à la portée des laboratoires ordinaires, peu coûteuse et donnant seulement un ordre de grandeur.

C'est dans cet esprit que nous avons poursuivi nos recherches, écartant d'emblée certaines techniques qui demandaient parfois deux jours d'attention et d'adresse.

C'est aussi pourquoi nous avons renoncé aux nombreux tests biologiques qui ont rendu de si grands services en permettant les premiers pas de l'hormonologie sexuelle. Ces tests demandent tous des précautions très nombreuses, des élevages importants, un personnel très spécialisé. En outre, si leur sensibilité paraît en général très grande, leur fidélité l'est fort peu.

L'interprétation du test d'Allen et Doisy, par exemple (le plus ancien et le plus utilisé), doit tenir compte des facteurs suivants :

1° La race des animaux (Girard, Marrian, Parkes) ;

2° Les variations personnelles dans une même race. On peut enregistrer ainsi des variations de 1 à 10 (Coward et Burn) ;

3° Le poids (Bugbee et Simond, Graber, Laqueur et de Jongh, Marrian et Parkes) ;

4° Les saisons, la luminosité, la température, l'état hygrométrique (Ikei, Parkes) ;

5° L'âge de la castration;

6° Le temps depuis lequel les sujets ont subi l'ovariectomie;

7° La fréquence des injections (Spasowicz) ;

8° L'importance de l'injection précédente (Kahnt et Doisy, Amour et Gustavson, Lipschutz et Veshnjakov, Tuisk, Adamberg) ;

9° La présence d'ovaires aberrants qui nécessite, avant l'utilisation, des examens préliminaires (Orban et Watrin, Castillo et Calatroni, Kostitch et Télébakovitch) ;

10° L'alimentation en général (Lœwe et Voss), les avitaminoses A (Evans et Bishop, Evans) et B (Nakamura), le taux des protides (Guilbert et Goss) qui provoquent des erreurs par défaut ou excès;

11° L'irritation mécanique de la muqueuse qui entraîne l'apparition de cellules kératinisées (Parkes, Fielding, Brambell, Gad-Andersen et Jarlow, Wade et Doisy, Huc et Frazier) ;

12° La voie d'administration (Laqueur, Hart et de Jongh). On a de grandes variations suivant que l'on utilise les voies sous-cutanée ou intramusculaire, intravaginale ou rectale;

13° Le véhicule (Burn, Marrian, Schœller, Dohrn et Hohlweg) ;

14° Enfin, l'interprétation même des aspects microscopiques des frottis vaginaux qui comporte une certaine part d'appréciation personnelle.

On comprend ainsi les difficultés immenses rencontrées lorsqu'on voulut fixer l'équivalence de l'unité biologique en unité internationale pondérale (1/10 de γ d'œstrone).

Voici d'ailleurs quelques résultats :

1 unité Rate = 0,3 γ d'œstrone (Société des Nations) ;
— — = 25 γ (Schœller, Dohrn et Hohlweg) ;
— — = 30 γ (Courrier et Reynaud).

Simonet trouva chez des animaux de même race, élevés dans son laboratoire, une réponse positive pour :

« 0,5 γ d'œstrone dans 3 p. 100 des cas
1 γ — — 10 p. 100 —
1,5 γ — — 20 p. 100 —
2 γ — — 35 p. 100 —
4 γ — — 7 p. 100 —

sans que, d'ailleurs, la sensibilité d'un même sujet restât constante ».

On s'aperçut alors bien vite « qu'il était illusoire de vouloir donner à ces unités une valeur absolue, car des différences minimes de technique et de réceptivité des animaux pouvaient affecter considérablement le seuil de la réaction, rendant impossible toute comparaison entre les résultats de divers auteurs » (Varangot).

On pourrait faire les mêmes critiques aux autres tests biologiques :

1° Formation du canal vaginal chez les Rongeurs (Doisy et Curtis) ;

2° Mucification de l'épithélium vaginal (Fluhmann) ;

3° Nombre de cellules chromaffines du ganglion du col utérin de la Souris (test de Blotevogel) ;

4° Modification du plumage de la Poule Leghorn brune (test de Juhn et Gustavson) ;

5° Sensibilité à l'action de la folliculine de l'ovopositeur du *Rhodeus amarus*, de l'*Acherlognatus intermedium* pendant la période de repos sexuel;

6° Augmentation du poids de l'utérus de la Rate ou de la Souris (test d'Astwood).

« Cette dernière méthode a l'avantage de substituer une pesée à l'examen d'un frottis; elle permet, d'autre part, de supprimer l'étalonnage préalable des animaux. Elle a l'inconvénient de nécessiter l'entretien d'un élevage important. »

Elle nécessite encore certaines remarques :

La sensibilité de la Rate et de la Souris varie beaucoup avec la nature de l'œstrogène considéré;

La Souris est dix à seize fois plus sensible vis-à-vis de l'œstrone que la Rate;

Vis-à-vis du benzoate d'œstradiol, au contraire, la Rate se montre quatre fois plus sensible que la Souris.

Or, dans les milieux biologiques, le mélange des différentes variétés chimiques d'œstrogène est un fait constant.

« Dans la pratique, il est impossible de réaliser un isolement des différentes substances hormonales qui sont contenues dans les urines sur un échantillon de l'ordre de quelques centaines de cm^3. On peut simplement exprimer que l'on trouve dans les urines des substances œstrogènes dont l'activité apparente (par rapport au test d'Allen et Doisy ou autres) sur des animaux étalonnés, équivaut à l'activité d'une quantité d'œstrone définie, mais il est absolument impossible de dire quelle est la quantité d'œstrone contenue dans l'extrait... Cette notion est généralement méconnue des médecins qui font doser dans les urines un mélange indéterminé d'œstrone et d'œstradiol. On se contente « d'envoyer les urines au laboratoire », et on a la satisfaction de recevoir un résultat chiffré qui est malheureusement trop généralement publié. On peut admettre que si l'on exprime en poids la quantité d'œstradiol et d'œstriol contenue dans les urines, les chiffres publiés comportent des erreurs de 1 à 10. On peut assurer que, dans les dosages hormonaux, le premier chiffre des résultats n'est sûrement pas exact. » (Mme Moricard.)

De ce bref aperçu sur les méthodes biologiques de dosage, nous conclurons que la variabilité des réponses est le seul caractère constant des tests biologiques.

Ils ont pourtant été employés exclusivement jusqu'à maintenant et ont permis des acquisitions de première importance grâce à un travail énorme et à des moyens matériels

considérables : Butenandt aurait sacrifié 40.000 Souris pour établir la formule chimique brute de l'œstrone.

Les méthodes biologiques de dosage postulent que des animaux de même race, de même âge, maintenus dans de semblables conditions, sont identiques, interchangeables, et doivent répondre de la même manière à l'injection du même produit. Cet aphorisme que l'on a voulu ériger en dogme philosophique et appliquer à l'échelle humaine se heurte constamment à des résultats expérimentaux indiscutables.

C'est pourquoi, croyons-nous, l'avenir appartient aux méthodes chimiques; les tests biologiques comportent des inconvénients insurmontables, tandis que les méthodes chimiques sont toujours améliorables.

*
**

A la fin de l'année 1946, nous sommes entré au Laboratoire de chimie biologique, où M. le Professeur agrégé F. Tayeau a bien voulu nous recevoir malgré le peu de garanties que nous offrions et notre compétence plutôt restreinte. Nous pensions d'abord nous mettre en mains la technique de Jayle, Crépy et Judas *(Bulletin de la Société de chimie biologique,* 1943, *t.* 25, p. 308) puis, dans un deuxième temps très proche, l'utiliser pour l'étude de l'élimination des œstrogènes pendant la gestation normale et pathologique.

Après six mois de recherches, nous avons dû conclure que cette méthode ne permettait pas d'extraire de l'urine une substance suffisamment pure pour pouvoir être évaluée avec certitude par la réaction de Kober.

De plus, le temps nécessité et les soins demandés feront reculer les laboratoires qui ne se préoccupent pas uniquement de mettre au point des méthodes de dosage, mais de les utiliser. A notre point de vue, c'est là son plus grave défaut.

Après notre échec dans l'utilisation de la technique de

JAYLE, nous nous sommes tourné vers celle que le Docteur MAYER a bien voulu nous communiquer si aimablement en y ajoutant des conseils pratiques. Cette dernière, conçue dans un esprit plus utilitaire, ne nous a pas donné, sur le moment, des résultats satisfaisants. Nous pensons cependant que la technique d'extraction originale mériterait d'être reprise, tandis que la réaction colorée de KOBER, trop délicate, devrait être remplacée.

Nous nous permettons d'insister ici sur quelques points particulièrement destinés à ceux qui voudraient parcourir le même chemin que nous.

Le contact entre l'homme de laboratoire et le clinicien est presque toujours insuffisant, de telle sorte que le premier élabore des outils merveilleux dont le second reçoit le précieux dépôt sans pouvoir s'en servir.

Les conditions de travail de ces hommes sont totalement différentes : le premier dispose d'un matériel et d'un personnel sur lequel le second peut rarement compter.

Le clinicien a besoin de techniques simples exigeant fort peu de matériel, pouvant être mises en œuvre par des manipulateurs d'habileté courante.

Nous avons rarement rencontré de telles dispositions dans les publications que nous avons lues. Il semblerait, souvent, que l'homme de laboratoire travaille pour lui et lui seul, pour le plaisir de jongler avec les difficultés, d'accumuler les obstacles afin de les franchir élégamment.

Le clinicien, émerveillé, referme la publication... et n'y pense plus.

Peu de cliniciens, d'autre part, sont capables d'appréciations en matière de chimie : c'est pourquoi nous souhaiterions plus de prudence dans les affirmations concernant les possibilités des méthodes proposées.

Nous avons alors entrepris une étude systématique :

1° Des *réactions colorées* les plus importantes et de leurs exigences en matière de pureté de l'extrait;

2° Des moyens d'*extraction et de purification* des œstrogènes naturels.

Cet ordre, inverse de l'ordre chronologique, est celui des nécessités. Les exigences des moyens de dosage des produits extraits de l'urine conditionnent la pureté nécessaire à l'extrait. La très haute sélectivité des tests biologiques autorise des méthodes de purification grossières; il n'en est malheureusement pas ainsi pour les réactions colorées.

Que nos lecteurs n'espèrent pas trouver ici un travail complet et définitif. Souvent nous avons dû abandonner l'étude d'une technique d'extraction ou d'une réaction colorée dès le début :

— soit à cause d'un temps trop délicat au-dessus de l'habileté d'un manipulateur moyen,

— soit à cause d'un inconvénient qui nous paraissait prohibitif,

— soit, enfin, par suite de l'impossibilité de nous procurer les produits nécessaires.

Il eût été certes heureux que cette étude fut plus complète. Elle n'a été que superficielle. Nous avons voulu rapidement faire le tour des possibilités dans ce domaine.

Ce travail est purement analytique; malheureusement, nous n'avons pas atteint ce stade de la synthèse possible donnant naissance à une technique de dosage suffisamment simple et fidèle.

Nous nous proposons donc de passer d'abord en revue les principales réactions colorées en indiquant au fur et à mesure les remarques que nous avons faites à leur endroit.

Ensuite, les moyens d'extraction et de purification décrits par les auteurs et nos essais dans ce domaine.

CHAPITRE PREMIER

LES RÉACTIONS COLORÉES CONSIDÉRÉES COMME SPÉCIFIQUES

Les techniques mettant en jeu les réactions colorées restent les plus employées et ceci en raison des quantités particulièrement faibles d'œstrogènes trouvées dans les urines : le milligramme de folliculine par litre d'urine n'est atteint qu'au cours de la grossesse.

Bien des réactions colorées ont été décrites pour les œstrogènes, nous les rappellerons brièvement.

En 1929, WIELAND, STRAUB et DORFMULLER remarquent que les réactions de SALKOWSKI et de LIEBERMANN-BURCHARD, décrites pour le cholestérol, se montrent également positives avec les extraits urinaires contenant des œstrogènes : dans le premier cas, il se produit une coloration jaune; dans le second cas, une coloration jaune rougeâtre avec fluorescence verte. Cette fluorescence, qui est provoquée par l'acide sulfurique du réactif (MARRIAN), a d'ailleurs servi pour essayer de diagnostiquer la gestation chez la Jument (CUBONI, GALLOT et ROUSSEL).

TECHNIQUE DE KOBER

Deux ans plus tard, KOBER découvrait une réaction qui, par la suite, a reçu de multiples applications : après chauffage de l'œstrone en milieu sulfurique concentré et

refroidissement, l'addition d'eau provoque l'apparition d'une coloration rose très intense avec atténuation de la fluorescence verte. En substituant l'acide benzène sulfonique à l'acide sulfurique, l'intensité de la coloration est plus grande encore et la teinte obtenue peut être comparée avec celle d'une solution de rouge de crésol.

5 γ d'œstrone donnent ainsi la même intensité de coloration que 25 γ de rouge de crésol.

Enfin Kober remplaçait l'acide benzène sulfonique par l'acide β-naphtol-sulfonique, qui donne une coloration avec un maximum de densité optique vers 4.880 Å.

La réaction de Kober se montre très fugace et disparaît instantanément en présence d'eau oxygénée ou d'acétone.

Un grand nombre de recherches, dont nous résumerons l'essentiel, a été publié sur cette réaction.

Après avoir étudié la cinétique de la réaction et la mise en jeu du colorimètre de Lovibond, Cohen et Marrian notent que les extraits urinaires donnent des courbes de coloration très différentes de celles obtenues avec l'œstrone ou l'œstriol; ils en concluent que l'urine contient des substances gênantes qui interfèrent dans la coloration cherchée.

Dès lors, de multiples efforts se sont concentrés sur l'élimination de ces substances gênantes, et il faut bien reconnaître que bien peu de progrès ont été réalisés dans ce domaine.

Cohen et Marrian proposèrent d'abord de faire disparaître, grâce à l'emploi de l'eau oxygénée, la coloration propre aux œstrogènes; dans ces conditions, la coloration due aux substances gênantes ne serait pas touchée. Il suffirait donc de soustraire cette dernière de la coloration totale, primitivement obtenue, pour en déduire la coloration propre aux œstrogènes.

Malheureusement, l'action de l'eau oxygénée est beaucoup moins spécifique qu'on ne l'avait cru tout d'abord : ce réactif fait non seulement disparaître la coloration rose due aux œstrogènes, mais encore une partie de la colora-

tion brune provoquée par les impuretés (Bachman et Petitt). D'ailleurs, il n'existe de parallélisme entre les résultats obtenus par cette méthode et la technique biologique (Pincus, Wheeler, Young et Zahl) que pour l'œstriol, dans des urines de femmes enceintes de plus de six mois.

Notons que, récemment, Nestorescu et Ciurea seraient parvenus, grâce à des modifications dans les doses de réactifs mis en jeu, à rendre spécifique l'action de l'eau oxygénée.

Les quelques essais que nous avons faits sur ce sujet n'ont cependant pas confirmé les conclusions des auteurs roumains.

Dans une autre série de recherches, on a essayé de séparer les deux colorations grâce à leurs propriétés optiques. En opérant sous 4.200 Å, on doserait simplement la coloration brune due aux impuretés; sous 5.200 Å, la totalité. La différence entre les deux résultats obtenus correspondrait donc aux œstrogènes (Venning, Evelyn et Harkness).

Stimmel a proposé une technique basée sur le même principe et donne une formule permettant de déterminer la quantité d'œstrone.

Pour que le procédé soit applicable, il faut admettre alors que les caractères photométriques de la coloration brune sont toujours les mêmes d'une urine à l'autre, ce qui a été mis en doute par Bachman et Petitt.

Jayle, Crépy et Judas proposent d'éliminer la coloration due aux œstrogènes par addition d'acétone, et d'effectuer, comme dans les cas précédents, un dosage par différence.

Nos essais personnels sont décourageants, en accord avec ceux de Nestorescu et Ciurea : « nous avons établi que la décoloration spontanée ne peut donner de résultat que tout au plus pour des solutions d'œstrone pur. Dès que la solution contient des chromogènes complexes et variables provenant de l'urine, la décoloration est incomplète ou trop grande. Ou bien il se produit un trouble de la solution qui rend la mesure photométrique impossible... d'ailleurs

l'absorption d'un témoin à blanc diminue légèrement au bout de quelques heures, ce qui introduit une nouvelle source d'erreurs ».

Enfin, Stevenson et Marrian ont, tout récemment, proposé la mise en jeu de la chaleur (chauffage pendant une heure et demie, à 100°) qui provoquerait la disparition totale de la coloration rose due à l'œstrone.

Signalons, enfin, pour mémoire, les techniques de Stimmel, consistant à épuiser la solution colorée à l'aide d'acétate d'éthyle pour éliminer une grande partie de la coloration brune, et celle de Cartland, Meyer, Miller et Rutz qui, modifiant les conditions techniques de la réaction de Kober, prétendent la rendre plus sensible et plus spécifique.

La réaction de Kober, on le voit, est loin d'être commode et, malgré les travaux auxquels nous venons de faire allusion, il semble que sa mise en jeu n'ait pas donné les résultats que l'on avait espéré tout d'abord.

RÉACTION DE BACHMAN

Cette réaction colorée consiste à effectuer, en un seul temps, les deux stades (acide sulfurique ou acide β-naphtol-sulfonique puis eau) de la réaction de Kober.

Le réactif de Bachman (à base de phénol, d'acide sulfurique et d'eau) est versé sur l'œstrogène desséché; l'ensemble est alors porté au bain-marie à 150°. La coloration jaune primitivement observée vire graduellement au rose et atteint un maximum après sept minutes pour l'œstradiol, neuf minutes pour l'œstrone, et onze minutes pour l'œstriol; au delà, elle pâlit.

L'auteur a tracé, pour chacune de ces trois substances, la courbe représentative des variations de l'intensité de la coloration en fonction du temps de chauffage.

On a noté ainsi qu'à neuf minutes et demie de contact à 150°, les trois courbes passent par un même point,

Si, à ce moment, on refroidit les solutions, les colorations restent stables et leur intensité n'a diminué que de 10 p. 100 après vingt-quatre heures.

De plus, la courbe représentant l'intensité de la coloration en fonction de la quantité de substance est une droite entre 10 γ et 60 γ. Enfin, le réactif se conserve à la température ordinaire, en flacons teintés, pendant deux mois et demi, sans détérioration appréciable.

Recherches personnelles

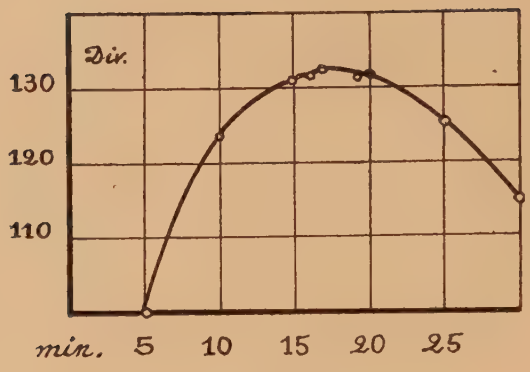
Nous nous sommes attaché à l'étude des modalités de cette réaction, que nous avons cherché à perfectionner.

Tout d'abord, nous avons tracé, pour les œstrogènes naturels, la courbe représentative des variations de l'intensité de la réaction en fonction du temps de chauffage à 150°. Nous avons bien retrouvé le maximum d'intensité décrit par BACHMAN, mais nous avons constaté que, le maximum une fois atteint, l'intensité de la réaction diminuait très rapidement, rendant ainsi les mesures assez délicates.

Nous avons donc effectué de nouvelles déterminations en opérant à des températures plus basses, et nous avons noté que, si la réaction mettait plus de temps à atteindre son maximum, ce dernier persistait beaucoup plus longtemps.

Nous pensons donc préférable d'opérer à une température plus basse que celle préconisée par BACHMAN.

Le maintien d'une température constante constitue un facteur important. Or, il s'avère difficile d'obtenir le résultat escompté avec un bain d'huile ou un bain de sable. Après un certain nombre d'essais, nous avons adopté la solution saturée de nitrate de sodium qui permet d'opérer à la température de 122°,5. Dans ces conditions, l'intensité maximum de coloration est obtenue après dix-sept minutes, et reste pratiquement constante entre la quinzième et la vingtième minute, ainsi que le montrent les résultats de nos mesures effectuées avec l'électrophotomètre de MEUNIER (sous 5.200 Å).

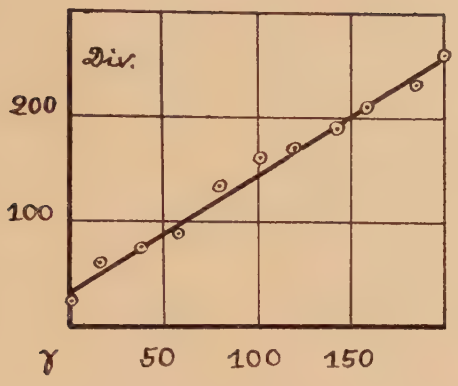


Intensité de la coloration
en fonction du temps de chauffage à 122°,5.

5	minutes	=	100	divisions
10	—	=	123	—
15	—	=	131	—
16	—	=	132	—
17	—	=	132,5	—
19	—	=	131,5	—
20	—	=	132	—
25	—	=	126	—
30	—	=	115	—

Le temps optimum (dix-sept minutes) ayant été ainsi déterminé, nous avons effectué quelques mesures avec des doses variables d'œstrone, chaque prise d'essai étant additionnée de 10 cm^3 du réactif de Bachman (épaisseur de la cuve : 1 cm., diaphragme : 10). Les résultats obtenus permettent de tracer la courbe de la densité optique en fonction de la quantité d'œstrone mise en jeu.

5 γ	d'œstrone	=	45	divisions
10 γ	—	=	58	—
50 γ	—	=	132	—
100 γ	—	=	200	—
150 γ	—	=	230	—
200 γ	—	=	255	—



Intensité de la coloration
en fonction de la quantité d'œstrone.

On peut encore opérer en présence de quantités plus grandes ou plus petites d'hormone, il suffit alors de modifier les doses de réactif et de diluant.

Voici, à titre documentaire, les résultats que nous avons obtenus avec des quantités beaucoup plus petites d'œstrone auxquelles nous avons ajouté 1 cm³ de réactif et 4 cm³ de diluant.

0,5 γ	d'œstrone	=	24	divisions
1 γ	—	=	25	—
2 γ	—	=	31,5	—
5 γ	—	=	50	—
10 γ	—	=	77	—

En opérant dans les conditions que nous avons décrites, les mesures s'avèrent commodes, et les résultats obtenus pour une même dose de substances restent très acceptables. C'est ainsi qu'en opérant avec une dose de 50 γ d'œstrone, nous avons obtenu successivement les chiffres suivants :

50 γ	d'œstrone	=	132	divisions
50 γ	—	=	131	—
50 γ	—	=	131,5	—
100 γ	—	=	201	—
100 γ	—	=	199,5	—
100 γ	—	=	203	—

Nous n'avons jamais conservé de réactif plus de deux mois; dans ces limites, les résultats restent constants d'une façon satisfaisante, à condition toutefois d'utiliser un flacon teinté bouchant émeri; il n'en est pas de même d'un réactif à l'autre, l'oxydation du phénol étant rapide lors de la fusion en vue de la préparation du réactif. Quelles que soient les précautions prises, il vaut mieux refaire, pour chaque nouveau réactif, une courbe d'étalonnage et, en conséquence, préparer une assez grande quantité de produit à la fois.

Voici, en résumé, la technique que nous préconisons :

a) Préparation du réactif et du diluant. (Voir Bachman, *Journal of biological Chemistry,* 1939, *131,* 456.)

b) Technique de la réaction colorée : préparer une solution saturée de nitrate de sodium; faire évaporer la solution d'œstrone; verser 2 cm^3 de réactif; porter au bain-marie dix-sept minutes en agitant de temps en temps; refroidir; diluer avec 10 cm^3 du mélange : SO_4H_2 + H_2O (3/7); effectuer la mesure sous 5.200 Å.

Cette réaction colorée présente sur les autres d'incontestables avantages de simplicité et de maniabilité. Elle ne nécessite pas du manipulateur des talents particuliers. Elle n'a qu'un défaut, toujours le même : si l'extrait urinaire est impur, la coloration brune parasite apparaît.

Stimmel avait signalé, en 1946, qu'on pouvait extraire une partie importante des colorations parasites de la réaction de Kober par traitement de la solution par un égal volume d'acétate d'éthyle; ce procédé élimine les impuretés sans toucher le pigment rose dû aux œstrogènes. L'acétate d'éthyle se sépare rapidement au-dessus de la phase aqueuse; l'opération peut être faite dans le tube même où a été effectué la réaction colorée.

Nous avons voulu savoir si la remarque de Stimmel, faite à propos de la réaction de Kober, se montrait applicable à la réaction de Bachman. Nous avons alors constaté qu'il en était bien ainsi.

Si l'on ajoute de l'alcool amylique ou butylique, ou de l'acétate d'éthyle, ou de l'azotate d'éthyle, ou de l'azotate d'amyle au réactif non dilué, ces produits se mélangent et sont ainsi susceptibles de faire disparaître le léger trouble que l'on rencontre avec certains extraits urinaires.

Après dilution, les alcools amyliques et butyliques sont capables d'extraire très énergiquement toutes les colorations, la rose comme la brune.

L'azotate d'éthyle reprendrait plutôt la coloration rose que l'autre ; mais le coefficient de partage est insuffisamment en faveur de la coloration rose.

L'acétate d'éthyle, acétate d'amyle n'extraient pas du tout la coloration rose, et *plus ou moins* la coloration brune.

Nous ne sommes donc pas parvenu par ce procédé à nous débarrasser totalement des colorations parasites.

Même avec la réaction de Bachman, qui aboutit à un pigment particulièrement stable, on note que la coloration reprise par l'alcool amylique ou lavée par l'acétate d'éthyle ou l'acétate d'amyle, s'affaiblit plus rapidement que si l'on s'abstient de toute manipulation.

D'autres solvants, tels que le chloroforme, le tétrachlorure de carbone, le sulfure de carbone, l'éther, le benzène, n'ont pas présenté de particularité intéressante.

La réaction de Bachman, surtout pratiquée suivant nos indications, permet un dosage colorimétrique des œstrogènes lorsque ceux-ci se trouvent à l'état pur, mais ne convient pas mieux que les autres lorsqu'elle se trouve effectuée sur un extrait urinaire impur.

RÉACTION DE PINCUS

Pincus a décrit, en 1943, une réaction colorée pour le dosage des androgènes. Cette réaction met en jeu le trichlorure d'antimoine et donnerait également une coloration avec le prégnandiol et le cholestérol.

Recherches personnelles

Nous avons eu l'idée de l'essayer pour les œstrogènes. Dans les conditions indiquées par l'auteur pour les androgènes, avec lesquels on obtient une belle coloration bleue, l'œstrone, l'œstradiol, le benzoate d'œstradiol donnent une coloration *rose* avec fluorescence verte, le diéthyl stilbœstrol une coloration rouge violette, la progestérone une coloration brunâtre.

Nous avons étudié la cinétique de la réaction avec les œstrogènes.

Nous n'avons pas pu pousser aussi loin que nous l'aurions voulu son étude, par manque de chlorure d'antimoine. Nous avons pu seulement noter les points suivants qui mériteraient d'être éclaircis :

1° La durée du temps de chauffage et la température à laquelle on opère influent sur l'intensité de la coloration d'une façon assez différente de celle indiquée par PINCUS pour les androgènes;

2° La quantité de réactif mise en jeu doit être plus élevée. Nous conseillons de mettre en jeu au moins 0,5 cm^3 de réactif;

3° Le milieu coloré peut être dilué aussi par l'acétone, le benzène, le chloroforme;

4° Utilisé sur un extrait urinaire obtenu par la méthode de JAYLE, il fait apparaître la coloration rose entachée malheureusement de la coloration brune habituelle.

Nous pensons que cette étude mériterait d'être reprise à cause de la facilité de mise en évidence de la coloration, de la stabilité du réactif et des couleurs caractéristiques qu'il donne avec les stérols sexuels.

D'autre part, le réactif de PINCUS présente encore d'autres avantages :

1° Il constituerait l'un des rares réactifs du prégnandiol (le réactif du GUTERMANN, mettant en jeu l'acide sulfurique seul, étant bien peu spécifique);

2° Il agirait sur des stéroïdes estérifiés (succinate et sulfate d'androstérone; succinate de déhydroiso-androstérone) (Pincus).

RÉACTION AU CHLORURE DE BENZOYLE

Nous n'avons aucune expérience personnelle de cette réaction; signalons seulement qu'elle présenterait l'intérêt, d'après Pincus et coll., de ne se produire qu'avec l'œstrone et l'œstradiol, et pas du tout avec l'œstriol.

***

RÉACTION A L'ACIDE GAIACOL-SULFONIQUE

Proposée par Sczego et Samuel, elle présente de grandes ressemblances avec la réaction de Kober. Cependant, l'auteur signale que l'œstriol ne donnerait pas non plus de coloration caractéristique. Seul l'œstrone et l'œstradiol réagiraient.

A cause de l'analogie avec la réaction de Kober, nous n'avons pas utilisé cette méthode.

***

RECHERCHES PERSONNELLES

Le réactif au méthyl glyoxal

Pensant que toute substance organique en milieu sulfurique concentré, surtout à chaud, finit par charbonner, nous avons été amené à chercher d'autres réactifs susceptibles d'échapper à cet inconvénient.

C'est alors que J. Masquelier nous suggéra d'essayer le réactif au méthyl glyoxal, que Denigès avait proposé, en 1909, « comme réactif général de la coloration en chimie analytique, à cause de ses possibilités de se condenser, soit seul, soit en présence de brome naissant, avec un grand

nombre de composés cycliques à liaisons multiples, et particulièrement avec les phénols ».

Préparation du réactif au méthyl glyoxal, d'après Denigès

« Mettre dans un flacon de 250 cm³, bouchant à l'émeri, 20 cm³ d'eau glycérinée au 1/20e en poids, 100 cm³ d'eau et 0,6 cm³ de brome. Le flacon étant bouché, agiter vivement jusqu'à dissolution du métalloïde.

« Introduire la solution glycérinée bromée dans un ballon d'environ 400 cm³, et la maintenir pendant vingt minutes au bain-marie bouillant. Retirer le ballon du bain et porter aussitôt son contenu à une grande ébullition pendant cinq à six minutes, de façon à chasser toutes traces de vapeurs de brome et à réduire le volume du liquide à environ 100 cm³.

« Laisser refroidir, ajouter 20 cm³ d'acide sulfurique pur, distiller et recueillir 50 cm³ du distillat, ce qui constituera le réactif cherché. »

Technique

Mélanger extemporanément l'acide sulfurique et la solution de méthyl glyoxal, dans la proportion de 3/0,4; diminuer autant que possible l'élévation de la température produite par la réaction en opérant dans un mélange réfrigérant. Le réactif ainsi préparé est à peine coloré.

Nous avons constaté alors que si l'on verse quelques gouttes du réactif au méthyl glyoxal sur de l'œstrone desséchée dans un tube à essai, et si l'on agite, le milieu se colore *immédiatement* en rose sans qu'il soit besoin de chauffer.

Ces résultats nous ont incité à entreprendre une étude plus approfondie de cette réaction.

Dans une première série d'essais, nous avons tout d'abord recherché la longueur d'onde permettant d'apprécier l'intensité maximum de la réaction. Nous avons donc étudié, pour diverses longueurs d'onde, la densité optique (expri-

mée en divisions de l'électrophotomètre de MEUNIER) d'un même liquide coloré. Voici nos résultats :

LONGUEUR D'ONDE EN Å	DIVISIONS
6.400	26
5.200	190
4.900	171
4.700	139
4.300	105

Ils montrent que c'est sous 5.200 Å que le maximum de densité optique se trouve obtenu.

Dans une seconde série d'essais, nous avons déterminé les proportions relatives d'acide sulfurique et de méthyl glyoxal permettant une intensité maximum de la réaction.

Nous avons donc effectué divers mélanges contenant tous 100 γ d'œstrone et des quantités variables d'acide sulfurique et de méthyl glyoxal.

SO_4H_2	M. G.	RÉSULTATS
2 parties	1,4 partie	Pas de coloration
2,5 —	0,9 —	58,5 divisions
3 —	0,4 —	165 —
3,2 —	0,2 —	150 —
3,3 —	0,1 —	120 —

Nos résultats, réunis ci-dessus, montrent que le maximum de coloration est obtenu avec 3 parties d'acide sulfurique et 0,4 partie de méthyl glyoxal, soient 7,5 parties d'acide sulfurique pour une partie de méthyl glyoxal.

Dans une troisième série d'essais, nous avons porté notre attention sur les facteurs temps et température. Voici les

variations de l'intensité de la réaction, effectuée à deux températures différentes en fonction du temps :

à 25°

Après 30 secondes	.....	157 divisions
— 1 minute	.....	152 —
— 2 minutes	.....	137 —
— 9 —	.....	110 —
— 12 —	.....	100 —

à 4°

Après 1 minute	.....	131 divisions
— 5 minutes	.....	130 —
— 10 —	.....	125 —
— 60 —	.....	106 —

La coloration faiblit donc avec le temps; et, finalement, devient jaune. En opérant à + 4°, on constate que la réaction persiste suffisamment longtemps pour permettre une évaluation satisfaisante.

La vitesse avec laquelle disparaît la coloration dépend de la quantité d'œstrone mise en jeu : si l'on opère à + 4°, on constate que la coloration met deux heures à disparaître avec 100 γ d'œstrone; elle met quatre et cinq heures avec des doses de 200 et 300 γ.

Enfin, nous avons tracé la courbe représentative des variations de la densité optique de la réaction en fonction de la quantité d'œstrone mise en jeu.

Pour cela, nous avons ajouté à des poids variés d'œstrone, 3,4 cm^3 de réactif au méthyl glyoxal, et après cinq minutes d'agitation à + 4°, nous avons, pour chaque mélange, déterminé la densité optique (exprimée en divisions de l'électrophotomètre de Meunier). Nos résultats se trouvent consignés dans le tableau suivant :

Poids		Divisions
0 γ	=	22
20 γ	=	60
40 γ	=	74,5
60 γ	=	86
80 γ	=	134
100 γ	=	154
120 γ	=	165
140 γ	=	192
160 γ	=	211
180 γ	=	233
200 γ	=	264

Malheureusement, avec deux réactifs différents, il est difficile d'obtenir exactement la même intensité colorée pour une même quantité d'œstrone; il faudrait, pour un dosage, faire chaque fois une courbe d'étalonnage avec au moins deux points très éloignés (par exemple 50 et 200 γ).

Pour des quantités inférieures à 20 γ, la coloration qui naît au contact des cristaux n'a pas le temps de se répandre également dans toute la masse de réactif qu'elle a déjà partiellement viré au jaune. Pour des quantités de cet ordre, il faudrait utiliser une cuve d'une capacité inférieure à 3,4 cm³ et nécessitant moins de réactif.

Le réactif au méthyl glyoxal donne :

Avec l'œstriol	coloration	rose.
— l'œstriol	—	—
— l'œstradiol	—	—
— le diéthyl stilbœstrol	—	rose rouge.
— le testostérone	—	jaune.
— le désoxycorticostérone ..	—	—
— le prégnandiol (due à SO_4H_2 seul)	—	—
— le benzoate d'œstradiol ..	—	—

Avec le cholestérol, il donne une coloration rouge vineux, et avec l'acide salicylique, une coloration violette; avec le crésol et le résorcinol, une coloration vermillon, et avec l'α-naphtol, une coloration bleue.

Dans une dernière série d'essais, nous avons effectué diverses recherches :

a) Nous avons tout d'abord cherché un diluant qui ne touche pas à la coloration; nous n'en avons pas trouvé. Nous ne sommes pas parvenu non plus à extraire la coloration de son milieu.

b) Signalons que le cholestérol donne une coloration rouge violette : si la réaction est pratiquée sur un résidu sec, la couleur ne diffuse pratiquement pas dans le réactif, seuls les cristaux se colorent; au contraire, si le cholestérol est en solution chloroformique, la phase organique prend une teinte rouge vineuse très intense, la phase acide étant incolore.

Si l'œstrone est en solution chloroformique, la coloration rose apparaît mais passe dans la phase acide.

Le benzène et l'éther se comportent comme le chloroforme.

c) Nous avons cherché à substituer un autre acide à l'acide sulfurique; seul l'acide phosphorique permet d'obtenir une coloration, mais celle-ci se montre plus faible qu'avec l'acide sulfurique.

d) Le méthyl glyoxal n'a pu être remplacé par un autre aldéhyde.

e) L'eau oxygénée éteint la coloration.

Nous avions espéré que cette réaction, obtenue à froid et immédiatement, allait peut-être permettre de caractériser les œstrogènes contenus dans un extrait urinaire préparé selon Jayle, sans être gêné par les substances parasites. Malheureusement, il n'en est rien, ce qui nous amène à supposer que les colorations parasites doivent être dues

probablement à la présence dans l'extrait urinaire de dérivés phénoliques.

En résumé, le réactif au méthyl glyoxal nous semble aussi spécifique que le réactif de Kober, aussi délicat dans son emploi, aussi exigeant en matière de pureté de l'extrait; il est cependant, comme réactif qualitatif, très pratique par la rapidité de ses réponses.

REMARQUES

Réactions colorées spécifiques de l'œstriol

Il existe, à notre connaissance, deux réactions colorées spécifiques:

1° Celle de David (chauffage avec SO_4H_2; dilution avec de l'eau, addition d'acide arsénique, nouveau chauffage). Coloration bleue.

Pincus et coll. ont étudié cette réaction et ont constaté qu'avec des extraits urinaires ils obtenaient un trouble rendant la mesure impossible; de plus, l'intensité de la coloration serait inférieure de moitié à celle que donne le réactif phénolique.

Nous avons souvent utilisé cette réaction pour des recherches qualitatives et fait des remarques analogues.

2° Celle de Bachman, en 1939. « Les œstrogènes chauffés avec un mélange d'acide phosphorique et de p.-phénolsulfonate de sodium, à une température de plus de 100°, donnent une couleur rose violette avec l'œstriol, tandis que les autres stéroïdes ne donnent que peu ou pas de coloration. »

Nous n'avons pas utilisé cette réaction.

3° Marrian, en 1939, dans le *Bull. New-York Acad. Med.*, **15,** 27, aurait publié une réaction nouvelle sur laquelle nous n'avons pu obtenir aucun renseignement.

Réaction colorée spécifique de l'œstradiol

Nous ne connaissons pas de réaction spécifique de cette hormone. On pourrait cependant l'évaluer par différence dans un mélange des trois œstrogènes.

Mesure de la quantité totale de substance par le réactif de Bachman, mesure de la quantité d'œstriol par le réactif de David ou de Bachman; dosage de l'œstrone par un réactif spécifique des cétones (Zimmerman ou R. de Girard), à soustraire de ce qui reste.

Œstradiol = œstrogènes totaux — (œstrone + œstriol).

CHAPITRE II

LES RÉACTIONS COLORÉES NON SPÉCIFIQUES

Parallèlement à l'étude des réactions colorées spécifiques, nous avons étudié celles des réactions non spécifiques propres à tout un groupe de substances :

— la réaction de diazotation des phénols, à laquelle sont attachés les noms de SCHMULOWITZ et WYLIE, la réaction de ZIMMERMAN, celle de GIRARD et SANDULESCO pour les cétones et les aldéhydes, celle de FOLIN et DENIS, etc.

Théoriquement moins satisfaisantes pour l'esprit, elles nous semblaient cependant pouvoir rendre des services dans le cas de produits purs ou bien d'extraits impurs ne contenant, outre la folliculine, que des substances ne réagissant pas avec le réactif utilisé.

RÉACTION DE ZIMMERMAN

En 1935, ZIMMERMAN a proposé le m-dinitrobenzène comme réactif spécifique du groupement méthylénique actif. L'année suivante, il envisageait son action sur un certain nombre de 17-cétostéroïdes dont l'androstérone, la testostérone, l'œstrone, etc.

Différents auteurs, par la suite, essayèrent de l'utiliser pour le dosage des androgènes urinaires.

Nous avons pensé l'appliquer au dosage de l'œstrone.

Comme tous nos prédécesseurs, nous avons constaté, dans le tube témoin, la présence d'une coloration rouge vineuse *constante, très intense* et *analogue* à celle que donnent les 17-cétostéroïdes en général.

Recherches personnelles

Nous nous sommes donc efforcé de faire disparaître ou de diminuer cette coloration de base.

Nous avons tout d'abord pensé que cette coloration relevait d'impuretés provenant de l'alcool éthylique utilisé. Pour les éliminer, nous avons essayé de purifier l'alcool par distillation et rectification, par passage sur charbon activé, par addition de bisulfite et distillation en vue d'éliminer les aldéhydes.

Nos efforts ne se sont pas montrés couronnés de succès, car toujours une appréciable coloration est apparue.

Ayant alors remarqué que la quantité d'alcool employée influait sur la coloration, nous avons essayé de remplacer l'alcool éthylique par d'autres alcools de la série grasse de C_1 à C_5, ou par le glycérol (tous ces produits de qualité R. P.). Nous avons toujours obtenu une importante coloration de base; faut-il admettre que la fonction alcool est en cause ?

Les propriétés réactionnelles connues de cette fonction ne permettent pas, cependant, une telle interprétation, nous proposons donc l'explication suivante :

— on sait qu'une des principales propriétés des dérivés nitrés est de donner naissance, par réduction, à toute une série de composés azotés de moins en moins oxygénés, dont le terme ultime est une amine. Nous ne parlons ici que de la réduction en milieu basique. Elle nous permettrait d'expliquer la formation concomitante d'aldéhyde à partir de l'alcool au cours de la réaction elle-même. Sous l'effet d'un tel milieu apparaîtrait un composé bi-moléculaire provenant de la condensation de deux dérivés de réduction du m-dinitrobenzène. C'est ainsi qu'un réducteur doux,

comme la solution alcoolique de potasse, se montre capable de provoquer la formation de composés du type azoxy à partir du dérivé nitré, l'alcool jouant le rôle de désoxydant en passant à l'état d'acétate de potassium. La réaction peut s'écrire :

$$4\,Ar\text{-}NO_2 + 3\,C_2H_5OH + 3\,KOH \rightarrow$$
$$CH_3COOK + 2\,Ar\text{-}N\text{-}N\text{-}Ar + 6\,H_2O$$
$$\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad \diagdown\!\diagup \quad O$$

Cette transformation de l'alcool en son dérivé le plus oxygéné, l'acide, se fait, on le sait, par l'intermédiaire de corps carbonylés, $>C=O$. C'est ici qu'il pourrait y avoir formation de R-CHO qui serait peut-être responsable de la coloration de base.

Cette manière de voir permet de comprendre les remarques suivantes :

1° Callow (N. H.) et Callow (R. K.) ont signalé que l'action de l'alcool et de la soude sur le m.-dinitrobenzène, en vue de sa purification, ne doit pas être prolongée au delà de cinq minutes : un traitement excessif fait apparaître des aiguilles jaunes identiques à celles du 3-3' dinitroazoxybenzène.

Si l'on ajoute expérimentalement de l'éthanol, la coloration augmente; ce groupement a donc bien la même action que le groupement cétonique.

Plus la quantité d'alcool employé est grande, plus la coloration de base est intense.

L'alcool absolu donne un témoin plus intense que l'alcool à 95°.

2° Callow (N. H.) et Callow (R. K.), Friedgood et Whidden, Cahen et Salter ont tous signalé l'intensification de la coloration de base par augmentation de la quantité de potasse mise en jeu, ce qui accentue probablement le pouvoir réducteur du mélange : potasse + alcool.

3° Cahen et Salter ont pu mettre en évidence, lors de la réaction de Zimmerman sur un 17-cétostéroïde, la forma-

tion de deux pigments : l'un rose, propre à l'hormone, l'autre jaune, indépendant. Ce dernier ne serait-il pas dû à l'action de l'aldéhyde sur le m.-dinitrobenzène ?

Nous pensons donc qu'il est impossible de faire disparaître la coloration de base de la réaction de ZIMMERMAN. Ce fait ne serait cependant pas tellement gênant si l'expérience montrait la constance de l'intensité de la coloration de base; mais nous avons justement constaté le contraire; par ailleurs, CALLOW (N. H.) et CALLOW (R. K.) ont mis en évidence que l'addition d'une même quantité de CH_3CHO à deux séries de tubes, l'une contenant une hormone cétonique, l'autre n'en contenant point, n'amène pas, dans les deux cas, une augmentation *égale* de la coloration totale. La présence de l'hormone modifie donc l'action du CH_3CHO sur le réactif.

Dans quelle mesure ? Comment le prévoir ?

C'est pourquoi, en conclusion, nous pensons que la réaction de ZIMMERMAN nous semble difficilement utilisable pour un microdosage.

RÉACTION DE DIAZOTATION

Les trois œstrogènes, œstrone, œstradiol, œstriol, présentent un même groupement phénolique que SCHMULOWIDZ et WYLIE ont utilisé en vue de la production d'une azo-couleur par action de l'acide diazobenzène sulfonique.

Recherches personnelles

Nous avons étudié cette réaction et voici, brièvement résumées, les remarques que nous avons pu faire :

a) La coloration jaune rosée présente son maximum d'intensité sous 4.300 Å pour l'œstrone, et sous 4.700 Å pour l'œstradiol. Beaucoup d'autres phénols donnent une réaction à peu près semblable.

b) La soude, comme l'ont noté les précédents auteurs, stabilise bien la réaction; voici quelques-uns de nos résultats confirmant ce point de vue :

1° Evolution de l'intensité de la réaction en fonction du temps, sans addition de soude :

TEMPS (EN MINUTES)	DIVISIONS DE L'ÉLECTROPHOTOMÈTRE
5	61,5
8	67
10	74
13	80
15	85
20	98
25	102
30	115

2° Addition de soude :

TEMPS (EN MINUTES)	DIVISIONS DE L'ÉLECTROPHOTOMÈTRE
2	115
10	114

c) La réaction se montre peu sensible.

d) La réaction se produit avec le conjugué glucuronique de l'œstrone.

e) Nous avons essayé de séparer, par chromatographie, les différents azoïques formés : il y a adsorption de la coloration, en haut d'une colonne d'alumine, à partir du milieu réactionnel lui-même et élution par le chloroforme. A l'époque où nous faisions cet essai, nous n'avions pas une habitude suffisante de la chromatographie pour pouvoir en tirer tout ce qu'elle pourrait donner ici.

Nous n'avons pas poursuivi plus avant l'étude de cette réaction, persuadé que nous étions de la nature phénolique des impuretés que donne la technique de JAYLE et analogues.

Il nous semblait très difficile de pouvoir distinguer la coloration jaune orangée propre aux œstrogènes de celle qui était due aux autres phénols urinaires.

RÉACTIF T DE GIRARD ET SANDULESCO

Girard et Sandulesco, en 1936, ont signalé que les hydrazones provenant de la combinaison du réactif T avec les cétones ou les aldéhydes se comportaient comme « de véritables sels d'alcaloïdes vis-à-vis des réactifs de précipitation de ce groupe ». C'est ainsi que l'addition, dans certaines conditions, d'iodomercurate de potassium au milieu, amène la précipitation des hydrazones.

Béraut et Vinet, en 1941, eurent l'idée d'utiliser cette propriété en vue du dosage des androgènes urinaires.

Nous avons essayé de l'employer pour le dosage de l'œstrone, grâce à l'amabilité du Docteur Chain, d'Oxford, Prix Nobel, qui a bien voulu nous rendre le grand service d'en prélever sur ses réserves.

Malheureusement, la décomposition spontanée du réactif T nous a très vite arrêté, car elle fait apparaître les substances qui se conduisent vis-à-vis de l'iodomercurate de potassium comme les hydrazones : le tube témoin présente un *trouble considérable* et *variable* avec l'âge du réactif.

Nous savons, par ailleurs, que d'autres laboratoires ont dû abandonner, pour cette raison, la technique de Béraut et Vinet.

RÉACTION DE FOLIN ET DENIS

Les grandes commodités de ce réactif des phénols, conservation, réponse immédiate et à froid, sont tentantes.

Une difficulté cependant apparaît : les œstrogènes sont peu ou pas solubles dans le milieu réactionnel, et l'intensité de la réaction atteint un plateau qu'elle ne peut dépasser; il correspond à la quantité maximum d'hormones qui peut s'y dissoudre.

En utilisant un solvant de la folliculine, lui-même soluble dans le milieu carbonaté, on peut entraîner l'œstrone en solution et établir une courbe d'étalonnage : on peut utiliser, au maximum, 1 cm^3 d'alcool éthylique ou 5 cm^3 d'acétone pour les 10 cm^3 de réactif; au delà, il se produit un précipité blanc.

Cependant, ce réactif est vraiment peu spécifique des œstrogènes.

Il existe encore bien d'autres réactions; mentionnons, pour mémoire :

1° La méthode de Sala, utilisant la fluorescence verte due à l'action de SO_4H_2 à chaud, sur la folliculine;

2° La technique de Petit (dosage de quelques aldéhydes et cétones par la nitrophénylhydrazone);

3° La méthode de Kleiner : la folliculine, comme tous les phénols, donne, avec l'anhydride phtalique, une substance colorée.

Nous n'avons pas étudié ces dernières réactions.

CONCLUSIONS

Il existe un grand nombre de réactions colorées suffisamment spécifiques, permettant de caractériser les œstrogènes. Parmi toutes ces réactions, nous retiendrons particulièrement celle de Bachman, qui nous a paru fidèle et constante dans sa simplicité.

Nous avons proposé une nouvelle réaction, mettant en jeu le réactif au méthyl-glyoxal de Denigès, qui présente sur les autres l'avantage de se produire à la température ordinaire et immédiatement.

La plupart des réactions colorées conviennent fort bien lorsque l'on opère un dosage sur un produit pur. Il n'en est plus de même, malheureusement, lorsque l'on a affaire à un extrait urinaire impur, des colorations parasites venant masquer la réaction essentielle.

CHAPITRE III

L'EXTRACTION DES ŒSTROGÈNES DE L'URINE

Si l'étude des réactions colorées est loin d'être close, celle des méthodes d'extraction et de purification reste à peine ébauchée.

Nous avons terminé le chapitre précédent en concluant que la plupart des réactions colorées proposées pour le dosage des œstrogènes convenait fort bien lorsque ces derniers se trouvaient à l'état pur, mais qu'il n'en était plus du tout de même lorsque l'on opérait sur un extrait urinaire.

Dans ce dernier cas, des colorations parasites viennent interférer avec celle due aux œstrogènes.

Bachman et Petitt ont défini le degré de pureté d'un extrait urinaire par le rapport de l'intensité de la coloration rose, due aux œstrogènes, à celle de la coloration brune provenant des impuretés; plus le rapport se montre élevé, plus l'extrait auquel on a affaire est pur. Bachman et Petitt ont pu montrer que, si le rapport est de 3, l'erreur par excès est voisine de 10 p. 100; pour un rapport inférieur, l'erreur croît rapidement.

Rien d'utilisable dans ce domaine n'aura été fait avant que l'on aboutisse à une technique :

— suffisamment courte, donc fidèle, car la multiplication des manipulations aboutit à des pertes considérables et, surtout, variables;

— ne nécessitant ni un matériel, ni un personnel extraordinaires, pour qu'elle soit à la portée du laboratoire de clinique;

— donnant un produit d'une pureté telle qu'il présente, avec la réaction de KOBER, un rapport 5.200/4.200 supérieur à 3.

On sait, depuis longtemps, que les œstrogènes se trouvent dans l'urine sous une forme libre — directement extractibles par les solvants ordinaires de ces corps — et en quantité beaucoup plus abondante, sous une forme combinée avec les acides sulfurique ou glucuronique; dans ce dernier cas, la solubilité est très différente.

Les proportions de ces deux formes varieraient suivant le moment physiologique et les modifications du métabolisme normal. Il importe donc de connaître exactement les solvants des œstrogènes libres et combinés; trop de recherches ont été faites sans une connaissance préalable suffisante de cette question.

Nous avons rassemblé ici les travaux qui nous ont paru les plus intéressants :

COEFFICIENTS DE PARTAGE ENTRE DEUX SOLVANTS NON MISCIBLES

(BACHMAN et PETITT, 1941.)

100 cm³ de : « A »	100 cm³ de : « B »	p. 100 d'œstrogène dans « B »		
		ŒSTRONE	ŒSTRADIOL	ŒSTRIOL
Eau.	Benzène	100	100	22
20 p. 100 ClNa	—	»	»	67
1,0 NaOH N	—	18	4	0
0,1 NaOH N	—	55	19	0
0,1 NaOH N + 20 p. 100 ClNa	—	96	82	»
0,05 NaOH N + 20 p. 100 ClNa	—	96	97	»
2,0 NH_4OH N	—	»	71	0
1,0 NH_4OH N	—	93	81	0
0,1 NH_4OH N	—	96	81	0

100 cm³ de : « A »	100 cm³ de : « B »	p. 100 d'œstrogène dans « B »		
		ŒSTRONE	ŒSTRADIOL	ŒSTRI
Eau.		—	—	—
9,0 p. 100 CO_3Na_2	Benzène	100	98	
0,9 p. 100 CO_3Na_2	—	»	»	
0,09 p. 100 CO_3Na_2	—	»	»	
9,0 p. 100 CO_3HNa	—	»	»	4
0,9 p. 100 CO_3HNa	—	»	»	1
0,9 p. 100 CO_3HNa dans CO_3Na_2 (0,9 p. 100).	—	»	»	1
10,0 ClH N	—	91	70	
6,5 ClH N	—	100	98	1
4,0 ClH N	—	100	98	1
0,5 ClH N + 20 p. 100 ClNa	—	»	»	6
4,1 SO_4H_2/H_2O (1)	—	0	»	»
2,1 SO_4H_2/H_2O (1)	—	60	»	»
1,1 SO_4H_2/H_2O (1)	—	94	77	»
4,5 SO_4H_2/H_2O (1)	—	»	90	»
2,3 SO_4H_2/H_2O (1)	—	»	90	»
1,2 SO_4H_2/H_2O (1)	—	98	92	»
20 p. 100 Ethanol (1)	—	»	»	1
10 p. 100 Ethanol (1)	—	»	»	1
Eau.	Ether éthylique	»	»	9
1,0 NaOH N	— —	38	38	
0,1 NaOH N	— —	67	67	
0,1 NaOH N dans 20 p. 100 ClNa	— —	95	»	»
0,02 NaOH N	— —	91	»	»
0,01 NaOH N	— —	95	»	»
9 p. 100 CO_3Na_2	— —	98	98	8
9 p. 100 CO_3HNa	— —	100	100	10
Eau.	Ether de pétrole	77	44	
50 p. 100 Méthanol (1)	— —	6	0	»
50 p. 100 Ethanol (1)	— —	7	0	
40 p. 100 Ethanol (1)	— —	12	3	
30 p. 100 Ethanol (1)	— —	36	8	
Eau.	(Ether de pétrole	»	»	
30 p. 100 Ethanol	+ Benzène [1/1]).	98	76	

(1) En volume.

COEFFICIENTS DE PARTAGE ENTRE DES SOLVANTS NON MISCIBLES

(D'après Alan MATHER, 1942.)

		p. 100 dans la phase organique		
		ŒSTRONE	ŒSTRADIOL	ŒSTRIOL
Ether	Eau	»	»	86
	0,3 M CO_3Na_2	99,5	97,5	65
	0,1 M NaOH	50	70	2
	1 M NaOH	30	30	»
Alcool butylique	0,3 M CO_3Na_2	99,9	99,7	99,5
	0,1 M NaOH	90	97	85
	1 M NaOH	»	98	»
Benzène	0,1 M ClH	99,7	»	14
	0,3 M CO_3Na_2	99,6	95	2,5
	0,1 M NaOH	60	17	0,3
	1 M NaOH	20	5	»
Ether isopropylique	0,3 M CO_3Na_2	99,5	99,5	50
	0,1 M NaOH	50	65	2
	1 M NaOH	»	23	»
Toluène	0,3 M CO_3Na_2	99,6	97	2
	0,1 M NaOH	50	80	0,3
	1 M ClH	»	»	25
CCl_4	0,3 M CO_3Na_2	»	50	6,5
	0,1 M NaOH	15	5	2,5
$CHCl_3$	0,3 M CO_3Na_2	99,7	99	20
	0,1 M NaOH	92	50	1
	1 M NaOH	»	5	»
Ether de pétrole 35°-52°	0,3 M CO_3Na_2	15	5	0,2
	0,1 M NaOH	»	0,5	»
Ether dibuthylique	0,3 M CO_3Na_2	97	80	5
	0,1 M NaOH	»	45	1

(Pincus et Pearlman, 1942.)

	QUANTITÉS (en γ)	BENZÈNE	0,3 M. CO_3Na_2	
Œstrone	460	99,6	0,4	Dosage biologique.
	100-300	100	0,0	— colorimétrique.
	180	97,6	2,4	— biologique.
Œstradiol	100-300	98,0	0,0	— colorimétrique.
Œstriol	1.200	2,4	97,6	— biologique.
	100-300	2,0	98,0	— colorimétrique.
	400	2,0	18,0	— biologique.

(Pincus et Pearlman, 1942.)

		BENZÈNE	ALCOOL A 70 p. 100	
Œstrone	650	75	25,0	Dosage biologique.
	412	72,5	27,5	
Œstradiol	63	50	50	
Œstriol	41	52	48	
	400	13,2	86,8	

SOLUBILITÉ DE QUELQUES ŒSTROGÈNES

(D'après Doisy et coll., 1941.)

(En grammes de substance pour 100 grammes de solvant.)

	Œstrone		Œstradiol		Œstriol	
	10°	30°	10°	30°	10°	30°
Méthanol	0,33	0,63	3,03	4,1	1,66	2,02
Ethanol 95 p. 100	0,35	0,666	2,29	3,56	1,20	1,65
Buthanol	0,33	0,60	2,61	4,15	0,567	0,738
Ether buthylique	0,041	0,71	0,0930	0,162	—	0,0053
Benzène	0,056	0,13	0,0220	0,054	—	—
Toluène	0,052	0,099	0,0150	0,0456	—	0,0034
Acétone	1,21	1,78	4,59	7,24	0,27	0,414
Chloroforme	0,255	0,53	0,0920	0,087	—	0,0032
Dioxane	2,11	2,84	—	—	0,63	0,97
Pyridine	—	—	—	—	31,1	33,8
Ether de pétrole (*).	—	0,71	—	8,9	—	5

(*) En γ par cm³.

(D'après Cohen et Marrian, 1934.)

Solvant	NaOH	$\frac{\text{Œstrone dans NaOH}}{\text{Œstrone dans solvant.}}$
Ether	N/10	Approximativement : 1/4
—	N	— : 2/1
Toluène	N/10	— : 2/3
—	N	— : 4/1

(D'après Butenandt et Westphal.)

Solubilité de l'œstrone dans l'eau : 2 mg. par litre.

Nous n'avons pas fait de vérification de ces chiffres parce qu'ils sont parfaitement concordants, bien qu'obtenus par des méthodes diverses.

Il nous a semblé intéressant, pour donner plus d'expression à ces résultats bruts, d'essayer d'en déduire, pour l'œstrone et l'œstriol, la liste des solvants par ordre décroissant de leur pouvoir.

ŒSTRONE		ŒSTRIOL	
Pyridine	?	Pyridine	33
Dioxane	2,11	Méthanol	2,02
Acétone	1,21	Ethanol	1,65
Ethanol	0,35	Dioxane	0,97
Méthanol	0,33	Butanol	0,73
Butanol	0,33	Acétone	0,41
Chloroforme	0,25	Ether	?
Benzène	0,056	Toluène	0,0034
Toluène	0,052	Benzène	?
Ether	?	Chloroforme	0,0032
Tétrachlorure de C.	0,02	Tétrachlorure de C.	?
Ether de pétrole	0,0033	Ether de pétrole	?

Autrement dit, les solvants non miscibles à l'eau peuvent être rangés ainsi :

Œstrone	bons solvants	Butanol	0,33
		Chloroforme	0,25
	médiocres	Benzène	0,05
		Toluène	—
		Ether	—
		Tétrachlorure de C.	0,02
	mauvais	Ether de pétrole	0,0033

Œstriol	bons solvants	Butanol	0,73
	médiocres	Ether	
	mauvais	Toluène	0,03
		Benzène	—
		Chloroforme	—
		Tétrachlorure de C.	—
		Ether de pétrole	—

Ces diverses constatations nous suggèrent quelques remarques :

1° L'œstradiol se comporte, d'une façon générale, à peu près comme l'œstrone; l'œstriol, au contraire, montre des propriétés différentes. Cela tient au fait que les deux premiers présentent un caractère phénolique faible, alors que celui du second est fort. Un comportement comparable peut être mis en évidence lors de la chromatographie sur alumine : l'élution de l'œstrone et de l'œstradiol se fait pratiquement en même temps, l'œstriol se trouve nettement séparé des autres.

2° Seuls le butanol et l'éther ont à peu près les mêmes propriétés de solubilité vis-à-vis des deux groupes phénoliques faible et fort, tandis que le chloroforme, le benzène et le toluène se comportent très différemment : excellents solvants des phénoliques faibles, ils dissolvent très mal l'œstriol. Cette propriété sera d'ailleurs utilisée pour la séparation des deux fractions (Bachman et Petitt).

3° L'éther de pétrole, très mauvais solvant des œstrogènes, est au contraire reconnu comme un excellent solvant des lipides en général, ce qui permettra à Butenandt, Szego et Samuel de mettre au point une technique de purification par extraction de l'alcool méthylique dilué à l'aide d'éther de pétrole ou de pentane.

4° L'addition de chlorure de sodium au milieu aqueux diminue beaucoup la solubilité des œstrogènes et facilite

ainsi leur extraction; malheureusement, Bachman et Petitt ont remarqué que la présence de certaines impuretés dans le milieu modifie de façon imprévisible les propriétés du solvant utilisé.

5° La non-miscibilité des solvants est loin d'être absolue, en particulier pour l'éther et le butanol.

6° La présence d'émulsions est parfois fort gênante (éther-urine; benzène-soude; chloroforme-soude, etc.); quelques gouttes d'alcool octylique ou d'acide chlorhydrique aident à les briser.

7° Le butanol est, à notre connaissance, le seul solvant non miscible à l'urine qui ait été étudié pour l'extraction des œstrogènes conjuguées. Venning et coll. sont les seuls qui aient rapidement touché cette question.

HYDROLYSE

Beaucoup d'auteurs ont étudié cette question. Parmi eux, mentionnons :

Marrian, 1933; Cohen et Marrian, 1934; Borchardt et Dingemanse, Laqueur, 1934; Smith (G. V. S.) et Smith (O. W.), 1937; Smith (G. V. S.), Smith (O. W.) et Georges, 1941; Venning et Evelyn, Harkness, Browne, 1937.

L'hydrolyse se produit sous l'influence de divers facteurs biologiques ou chimiques; qu'il nous suffise de rappeler simplement quelques résultats obtenus par Marrian :

Urine acidifiée	1.250	unités	biologiques.
— — et soumise à l'ébullition	5.600	—	—
— alcalinisée	2.070	—	—
— soumise à la décomposition	12.500	—	—

La température et le temps pendant lequel est effectuée l'hydrolyse constituent deux facteurs essentiels.

Cohen et Marrian ont dressé le tableau ci-dessous, mettant bien en évidence l'importance de ces deux facteurs.

	Avant hydrolyse	Après hydrolyse à 100°		A 37°			A l'autoclave (120°)	
		2 h.	16 h.	48 h.	2 s.	4 s.	1h.	4 h.
	—	—	—	—	—	—	—	—
Œstrone ..	0,024	0,046	0,070	0,065	0,080	0,047	0,070	0,08
Œstriol ...	0,420	0,540	0,800	0,620	1,120	0,560	0,620	1

Smith (G. V. S.) et Smith (O. W.) établirent qu'avec 15 volumes d'acide chlorhydrique pour 100 volumes d'urine, l'hydrolyse était obtenue au bout de dix minutes, à 100°, avec le minimum de destruction.

Venning et coll. ont essayé l'hydrolyse avec divers acides : l'acide chlorhydrique serait le plus satisfaisant. Avec 0,5 cm^3 ou 0,6 cm^3 d'acide concentré pour 100 cm^3 d'urine, on obtiendrait une hydrolyse convenable après deux à quatre heures à l'autoclave (120°). Une concentration plus élevée en acide chlorhydrique donnerait par destruction un chiffre inférieur; enfin, la concentration de l'extrait urinaire lui-même jouerait un rôle.

En 1941, les Smith ont remarqué une libération plus importante de substances œstrogènes par l'hydrolyse zincique (1).

A cet effet, nous avons soumis à la putréfaction l'urine à analyser. Sur le conseil du Docteur Moureau, nous avons placé cette dernière à l'étuve à 37°, après l'avoir ensemencée avec un coli urinaire.

Nous avons alors constaté qu'après vingt-quatre heures, on obtenait une libération considérable d'œstrogènes, supérieure même à celle obtenue par voie chimique. Malheureu-

(1) Il y aurait plutôt transformation partielle d'œstrone, peu active biologiquement, en œstradiol plus actif, d'où une augmentation du pouvoir œstrogène de l'urine.

sement, les substances « gênantes » ont, elles aussi, été libérées.

Enfin, certains auteurs (Friedgood, Taylor et Wright, Hersberg et Wolfe, Callow [N. H.] et Callow [R. K.], Emmens, Stroud) ont songé à préserver les œstrogènes, susceptibles d'être détruits par l'acide, en les captant au fur et à mesure de leur libération. Le tétrachlorure de carbone, entre autres, a été proposé. Mais le rendement obtenu s'est montré bien peu satisfaisant.

Malgré tous ces travaux, on ne sait pas encore quelles sont les conditions optima permettant de réaliser l'hydrolyse dans les meilleures conditions. On se rendra compte du désaccord qui existe en examinant le temps d'hydrolyse proposé par divers auteurs :

Deux minutes, à 100° (Kober) ;

Dix minutes, à 100° (Talbot et coll.) ;

Une heure, à 100° (Bachman et Petitt, Szego et Samuel) ;

Une heure et demi, à 100° (Jayle et coll.) ;

Deux heures à quatre heures, à 120° (Venning et coll.) ;

Trois heures, à 120° (Stimmel, janvier 1946) ;

Quinze minutes, à 100° (Stimmel, septembre 1946).

Le problème de l'hydrolyse, on le voit, est loin d'être résolu. Notons qu'il intéresse les méthodes biologiques de dosage aussi bien que les méthodes chimiques, et qu'aucun résultat ne pourra donc être interprété avant sa solution.

EXTRACTION

On s'est servi principalement de l'éther, du benzène, du chloroforme et du butanol.

Selon notre expérience personnelle, le chloroforme serait l'un des plus intéressants. Inférieur au butanol quant au pouvoir d'extraction, il lui est très supérieur par la qualité de l'extrait; le butanol, comme l'éther, entraîne, en effet, une énorme quantité d'impuretés et donne très facilement des émulsions. Il est, en outre, ininflammable et facile à

récupérer; il constitue malheureusement un médiocre solvant de l'œstriol.

Le tétrachlorure de carbone permet l'obtention d'un extrait presque incolore, mais il ne peut être employé facilement à cause du coefficient de partage trop peu en sa faveur.

L'éther constitue le solvant le plus commode et le plus employé pour l'extraction de l'œstriol.

A côté des méthodes mettant en jeu les solvants organiques, il convient de mentionner la technique de Mayer, de Bruxelles, qui utilise une méthode d'extraction originale; l'auteur fait apparaître dans l'urine un précipité d'acide benzoïque qui, par adsorbtion, entraîne la folliculine libre; entre nos mains, ce procédé nous a malheureusement donné un extrait très impur, comparable à celui que fournit l'éther. L'expérience que nous avons acquise par la suite dans l'étude des phénomènes d'adsorbtion, nous a conduit à penser que des recherches intéressantes pourraient être entreprises dans ce sens.

Venning et coll. et Stimmel ont employé le butanol pour extraire les œstrogènes sous forme combinée, avant de les soumettre à l'hydrolyse; ce procédé donne un extrait plus propre, mais son rendement n'a pas fait l'objet d'une étude définitive.

Le rendement de l'extraction semble, d'une façon générale, satisfaisant (90 p. 100).

En conclusion, l'extraction faite avec soin semble conduire, au moins pour l'œstrone, peut-être aussi pour l'œstriol, à des rendements satisfaisants, mais l'extrait obtenu est toujours très impur. Il se présente sous l'aspect d'une huile de couleur brune à forte odeur urineuse.

Tel quel, il peut être injecté à l'animal dont le vagin ou l'utérus ne réagissent qu'à la folliculine sans être influencés, croit-on, par les substances parasites. Malheureusement, les réactions colorées ne peuvent s'en contenter, la purification est donc un temps essentiel de la technique.

PURIFICATION

Seuls, trois grands groupes de procédés retiendront notre attention.

a) Méthodes mettant en jeu le coefficient de partage entre deux solvants non miscibles;

b) Méthode chromatographique;

c) Technique de Sulman (traitement de l'extrait urinaire par la chaleur).

1° Méthodes utilisant le coefficient de partage entre deux solvants non miscibles

Ce sont les premières auxquelles on ait pensé : elles ont permis à Butenandt et à Laqueur les remarquables travaux ayant conduit à l'isolement de l'œstrone cristallisée.

Malheureusement, cette technique provoque des pertes appréciables de produit. Elle consiste à soumettre la solution primitive à un certain nombre d'épuisements; chaque épuisement amène une perte de substances. Si l'on considère que la méthode de Venning et coll. comporte douze épuisements; celle de Jayle et coll., vingt-neuf; celle de Talbot, cinquante-quatre, on ne sera pas étonné d'obtenir des résultats par défaut.

La première donne un produit que l'on peut qualifier de grossier; celle de Jayle, avec un rendement que nous n'avons pas précisé, aboutit à un extrait encore trop impur pour la réaction de Kober; Bender et Wilson ont fait une étude très soigneuse de la troisième : d'abord surpris par des divergences considérables entre les résultats donnés par la méthode chimique et la méthode biologique, ils se sont efforcés d'extraire la totalité des phénols urinaires et ont effectué un dosage chimique avant et après cette opération.

Avant : 500 γ.
Après : 42 γ.

Ce dernier chiffre concordant mieux que le premier avec le résultat biologique. Si cette première expérience est discutable, la suivante l'est moins :

Après l'enlèvement complet des phénols de l'urine, les auteurs ajoutent 200 γ d'œstrone et pratiquent un dosage chimique, il leur est impossible de les retrouver; découragés, ils concluent : « même en dépit de cette modification, la technique de dosage des œstrogènes ne donne pas satisfaction ».

Nous eussions été étonné du contraire : les 200 γ d'œstrones ont été éparpillés au cours des cinquante-quatre extractions. A moins qu'ils n'aient disparu d'un seul coup, au cours d'une de ces redoutables maladresses qui surviennent bien au moins une fois sur cinquante-quatre manipulations.

Nous espérons qu'on ne pourra pas aller beaucoup plus loin que Talbot et coll. dans cette recherche de la pureté par la technique des coefficients de partage, et nous conclurons que cette méthode ne peut, à elle seule, aboutir à des produits purs sans entraîner des pertes inacceptables. Elle ne peut donc constituer qu'un temps préliminaire et insuffisant, comportant un minimum de manipulation.

2° Méthode chromatographique

La méthode chromatographique étant très sensible et hautement quantitative, elle paraissait toute désignée pour la purification des extraits urinaires. Cependant, l'extrait mis en jeu doit subir préalablement une première purification, car la méthode chromatographique ne peut convenir que dans la séparation d'un nombre relativement petit de corps très voisins.

Or, il semble bien que les impuretés qui suivent si étroitement la folliculine tout au long de sa purification soient aussi de nature phénolique.

Duchinsky et Ledérer avaient déjà utilisé l'adsorbtion sur alumine pour séparer, en vue de sa préparation industrielle, l'œstrone tirée des urines de la Jument gravide de

l'équilénine qui l'accompagne; ils avaient signalé que les pigments bruns étaient facilement adsorbés au sommet de la colonne.

En 1944, STIMMEL publia ses résultats dans l'étude de l'adsorbtion et de l'élution séparée des trois œstrogènes naturels à l'état pur.

Recherches personnelles

Nous avons essayé de l'utiliser pour la purification d'un extrait urinaire obtenu après extraction à l'éther, lavage au bicarbonate de sodium, extraction à la soude 2 N, acidification, extraction au chloroforme et lavage à l'eau.

La colonne, faite d'un tube de 5 mm. de diamètre intérieur, contient 500 mg. d'alumine pour chromatographie Rhône-Poulenc. Une trompe à eau active le passage des solvants.

On verse d'abord quelques cm^3 de chloroforme pur, puis 5 cm^3 de l'extrait chloroformique urinaire légèrement teinté en brun.

Les cinq premiers cm^3, après leur passage à travers la colonne, sortent parfaitement incolores et ne donnent, par évaporation, aucune réaction colorée. Le haut de la colonne d'alumine présente un anneau brun, puis une bande claire de 1 à 2 mm., enfin, un anneau de couleur jaune claire. Au-dessous, la colonne reste incolore.

Si l'on fait passer encore du chloroforme, soit pur, soit contenant un extrait urinaire, il y a élution de l'anneau jaune. L'éluant, incolore à l'œil, fait apparaître par évaporation des petits cristaux bien visibles au microscope polarisant, très légèrement teintés en jaune, et qui donnent la plupart du temps une coloration extrêmement nette et pure avec le réactif au méthyl-glyoxal ou le réactif de ZIMMERMAN.

15 cm^3 d'éluant lavent complètement la colonne; les 15 suivants restent vides de toute substance. Le haut de la colonne reste toujours coloré en brun.

Si l'on fait ensuite passer, comme l'indique Stimmel, du benzène contenant de l'alcool méthylique (3/1), une nouvelle fraction se trouve entraînée encore plus rapidement par les dix premiers cm^3; cette fraction cristallise rapidement, donne la réaction de Bachman, la réaction au méthylglyoxal, la réaction de David; celle de Zimmerman, au contraire, est négative. Il semble donc que la première fraction contienne l'œstrone et la seconde l'œstriol.

Nous avons vérifié sur des Rates castrées l'activité biologique de ces éluats, par le test d'Allen et Doisy.

La qualité des réactions colorées obtenues par cette méthode est remarquable, sans comparaison avec celle que donne les méthodes précédentes.

Notons que le tétrachlorure de carbone, le benzène, le toluène, le xylène ont été essayés à la place du chloroforme. Après traversée de la colonne, ils sont vides de substances et se montrent incapables, quelles que soient les quantités utilisées, d'éluer une fraction quelconque.

Au contraire, l'éther, l'acétone entraînent tout et ne permettent pas l'établissement d'un chromatogramme.

L'éther et le carbonate de sodium éluent les pigments bruns restés en haut de la colonne; ils donnent très vivement la réaction de Folin et Denis.

La moindre trace d'eau dans le chloroforme entraîne une modification de son pH et de son pouvoir éluant.

Avec l'œstrone pure, le rendement de l'élution est de l'ordre de 96 à 99 p. 100.

Les urines de Femmes enceintes ne se comportent pas toujours de la même façon : une fois sur trois environ, des souillures passent en petites quantités avec la fraction phénolique faible; les urines de la même Femme sont elles-mêmes variables d'un jour à l'autre.

Il nous a été possible, grâce à cette méthode, de mettre en évidence de l'œstrone pure dans les urines d'Homme, et de montrer que la fraction phénolique forte est la

plus abondante dans du sérum de Jument gravide, après destruction des protéines par l'alcool bouillant.

Heintzberger, en 1943, avait remarqué ces mêmes propriétés du benzène et de l'éther; il était aussi parvenu, par addition d'alcool, à séparer les fractions fortes et faibles, mais ces éluats étaient constamment souillés d'une façon inacceptable, probablement à cause de l'éther.

Stimmel, en 1947, publia les résultats de l'application de sa technique de chromatographie à un extrait urinaire. En accord avec lui, nous conclurons que la chromatographie permet, avec un rendement excellent, une purification très intéressante, mais pas toujours parfaite.

Il est cependant de toute évidence que nous n'avons pas épuisé toutes les possibilités; il existe de nombreux adsorbants, autant d'éluants et les combinaisons possibles sont en nombre presque infini.

3° La méthode de Sulman

Il y a trop peu de temps, nous avons eu connaissance d'une petite note de Sulman, publiée dans *Nature*. Cet auteur signale une méthode originale de purification basée sur « l'application de la haute température » : elle consiste à porter un extrait urinaire à une température de 250°, sans précautions spéciales; la folliculine se sublime tandis que les impuretés charbonnent et ne sont plus extractibles par les solvants ordinaires.

L'étude de cette technique est à peine commencée, mais déjà pleine de promesses. Nous rapporterons seulement les quelques détails qui suivent.

Nous avons utilisé comme moyen de chauffage un bain de sable assez volumineux pour constituer un volant thermique suffisamment constant. La température y est maintenue autour de 250°.

Quelques cristaux d'œstrone purs, déposés dans le fond d'un tube, sont introduits dans le bain de sable; ils se subli-

ment immédiatement et viennent se déposer juste au-dessus du niveau d'affleurement du sable chaud.

Ce traitement n'entraîne ni modification de la substance vis-à-vis des réactifs colorés, ni diminution de son pouvoir chromogène.

Un extrait urinaire brut ainsi traité charbonne abondamment dans le fond du tube en dégageant une odeur scatolique. Le lavage du tube par le chloroforme ou le benzène donne alors une solution légèrement colorée en jaune, donc encore impure; quelle est la nature de cette impureté ? Comment s'en débarrasser ? Cette étude est en cours.

CONCLUSION

De cette étude des méthodes d'extraction et de purification, se dégage nettement l'impression que les résultats obtenus sont encore trop sporadiques, séparés, pour qu'on puisse en déduire une technique valable; il reste à mieux connaître les différentes possibilités et leurs limites, afin de les combiner judicieusement.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

L'hormonologie gagnera beaucoup le jour où il sera possible de doser aisément et rapidement les diverses hormones sexuelles.

Actuellement, deux grands types de méthodes s'offrent à nous : les méthodes biologiques et les méthodes chimiques.

Les premières ont rendu d'éminents services. Elles sont d'une grande sensibilité, mais longues, onéreuses et infidèles. De plus, elles nécessitent toujours, au préalable, certaines manipulations chimiques (hydrolyse et extraction) de valeur très mal connue.

Nous avons cherché à utiliser les secondes (JAYLE, MAYER...), sans parvenir à retrouver les résultats satisfaisants qu'indiquent les auteurs.

Dans le but d'apporter une modeste contribution au problème du dosage des œstrogènes, nous avons entrepris une étude analytique des diverses réactions colorées de ces substances et des méthodes permettant leur extraction.

La réaction de BACHMAN nous a semblé particulièrement fidèle et commode à divers titres; légèrement modifiée, nous l'avons utilisée par la suite de façon courante.

Parmi les autres réactions (au chlorure de benzoyle, à l'acide gaïacol-sulfonique...), la réaction de PINCUS semble la plus intéressante.

Nous avons décrit une nouvelle réaction utilisant le méthyl-glyoxal en milieu sulfurique. Malgré des avantages certains de simplicité particulièrement intéressants pour une recherche qualitative, cette méthode exige un extrait

urinaire aussi purifié que les autres réactions déjà décrites.

Nous avons montré que la réaction de ZIMMERMAN présente une coloration parasite importante et surtout variable, gênante dans un microdosage.

La réaction de diazotation de SCHMULOWITZ et WYLIE, le réactif T de GIRARD et SANDULESCO, le réactif de FOLIN et DENIS ont été étudiés également.

De cette étude des réactions colorées, nous avons conclu que toutes, sans exception, exigeaient un extrait urinaire très purifié.

La deuxième partie de notre travail a été consacrée à l'étude des techniques d'extraction et de purification.

L'hydrolyse préalable donne un rendement assez mal connu.

L'extraction, au moins pour l'œstrone, est en général satisfaisante dans les diverses techniques proposées.

Trois groupes de méthodes ont été envisagés pour la purification.

La technique du coefficient de partage entre des solvants non miscibles donne un extrait très impur et entraîne des pertes considérables.

La chromatographie sur alumine a fait l'objet de longues recherches : elle permet, avec un rendement excellent, de purifier considérablement l'extrait urinaire et de séparer deux fractions : l'une phénolique faible (œstrone + œstradiol), l'autre phénolique forte (œstriol).

Le traitement par la chaleur, proposé par SULMAN, nous a semblé particulièrement intéressant, parce que simple et rapide. Son étude nécessite de nouvelles recherches.

*
**

Nous avions commencé ce travail, il y a deux ans, plein de confiance, ayant en tête quelques notions bien assises, quelques chiffres clefs, des conceptions pathogéniques vraiment satisfaisantes; nous étions prêt, en conséquence, à

manier énergiquement ces puissants œstrogènes naturels ou artificiels dont l'industrie nous inonde.

Ce travail, en définitive, nous a conduit au doute. Nous ne dirons rien des méthodes chimiques dont on ne s'est pas encore servi pour une étude clinique... Heureusement.

Mais que faut-il penser des connaissances actuelles dans le domaine de l'hormonologie sexuelle qui repose sur des observations cliniques indiscutables, mais aussi, et beaucoup trop, sur des résultats obtenus par des méthodes biologiques ? Que faut-il en penser si l'on veut bien considérer qu'ils ont été obtenus en injectant à des animaux de sensibilité indéterminée un mélange en proportion indéterminée de substances œstrogènes d'activité indéterminée que l'hydrolyse libère et détruit dans un rapport indéterminé ? Que l'on veuille bien noter, d'autre part, que le résultat en unité biologique sera traduit à Paris en un poids différent de celui de New-York, comme 1 et 90.

Seule présente une valeur la comparaison de chiffres très différents obtenus dans un même laboratoire par une même équipe; encore, ne doit-on en attendre qu'un ordre de grandeur.

Il reste beaucoup à faire. Ce sera l'œuvre de la chimie biologique; en attendant, la prudence est recommandée en pathogénie, nécessaire en thérapeutique.

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes Maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères, et s'ils devaient apprendre la médecine ou recourir à mes soins, je les instruirais et les soignerais sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Vu : *Le Doyen*,
R. DUPÉRIÉ.

Vu, bon à imprimer :
Le Président,
M. RIVIÈRE.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 25 Novembre 1948.
Le Recteur,
A. MARCHAUD.

BIBLIOGRAPHIE

ALLEN (E.) et DOISY (E. A.). — *J. Am. Med. Ass.*, 1923, **81**, 819.

AMOUR (F. E. D') et GUSTAVSON (R. G.). — *J. Pharm. Exper. Ther.*, 1930, **40**, 473.

BACHMAN (C.). — *J. of Biol. Chem.*, 1939, **131**, 455.

BACHMAN (C.). — *J. of Biol. Chem.*, 1939, **131**, 463.

BACHMAN (C.) et PETITT (D. S.). — *J. Biol. Chem.*, 1941, **138**, 689.

BÉNARD (H.), SIMONNET (H.) et HORN (A.). — *Paris Médical*, 1946, **36**, 293-296.

BORCHARDT (E.), DINGENANSE (E.) et LAQUEUR (E.). — *Naturwiss*, 1934, **27**, 190.

BENDER et WILSON. — *Biochem. J.*, 1947, **41**, 423.

BÉRAUT (E.) et VINET (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 59.

BLOTEVOGEL (W.). — *Anat. Anz.*, 1928, **66**, 31.

BUGBEE (E. P.) et SIMOND (A. E.). — *Endocr.*, 1926, **10**, 191.

BURN (J. H.). — *Q. J. Pharm.*, 1929, **2**, 63.

BUTENANDT (A. Z.). — *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1930, **191**, 127.

CAHEN (R. L.) et SALTER (W. T.). — *J. Biol. Chem.*, 1944, **152**, 489.

CALLOW (N. H.) et CALLOW (R. K.). — *Biochem. J.*, 1938, **32**, 1759.

CALLOW (N. H.), CALLOW (R. K.), EMMENS (C. W.) et STROUD (S. W.). — *J. Endocr.*, 1939, **1**, 76.

CARTLAND (G. F.), MEYER (R. K.), MILLER (L. C.) et RUTZ (M. H.). — *J. Biol. Chem.*, 1935, **109**, 213.

CASTILLO (E. B.) et CALATRONI (C.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **104**, 1025.

COHEN (S. L.) et MARRIAN (G. F.). — *Biochem. J.*, 1934, **28**, 1603.

COWARD (K. H.) et BURN (J. H.). — *J. Physiol.*, 1927, **63**, 260.

CUBONI (E.). — *Bull. Acad. Véter.*, 1925, **8**, 414.

CURTIS (J. M.) et DOISY (E. A.). — *J. Biol. Chem.*, 1931, **91**, 647.

DAVID (K.). — *Acta Brevia Neerland.*, 1934, **4**, 64.

DEMANGE (P.). — Thèse Méd., Bordeaux, 1943.

DENIGÈS (G.). — *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, mai 1909.

DOISY (E. A.), HUFFMAN (M. N.), THAYER (S. A.) et DOISY (E. A.). — *J. Biol. Chem.*, 1941, **138**, 283.

DUCHINSKY (R.) et LEDERER (F.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1935, **17**, 1534.

EMMENS (C. W.). — *Spec. Rep. Ser. Med. Res. Coun. Lond.*, 1939, 334.

Evans (H. M.). — *J. Biol. Chem.*, 1928, **77**, 651.
Evans (H. M.) et Bischop (K. S.). — *J. Med. Res.*, 1922, **1**, 335.
Evelyn (K. A.). — *J. Biol. Chem.*, 1936, **115**, 65.
Fluhmann (C. F.). — *Surg. gyn.*, 1931, **52**, 51.
Fraser (R. W.), Forbes (A. P.), Albright (F.), Sulkowitch (H.) et Rupenstein (E. C.). — *J. Clin. Endocr.*, 1941, **1**, 234.
Friedgood (H. B.) et Whidden (H. L.). — *Endocr.*, 1940, **27**, 258.
Friegood (H. B.), Taylor (E. H.) et Wright (M. L.). — *J. Clin. Endocr.*, 1943, **3**, 638.
Gad-Andersen (K.) et Jarlow (E.). — *Acta Scand.*, 1934-1935, **84**, 224.
Gallot (G.) et Roussel (G.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **111**, 1249.
Girard (A.). — *Brit. Med. J.*, 1932, **2**, 368.
Girard (A.). — *J. Pharm. Chem.*, 1933, **13**, 61.
Girard (A.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1933, **15**, 562.
Girard (A.) et Sandulesco (G.). — *Helv. Chem. Acta*, 1936, **19**, 1095.
Graber (H. T.). — *J. Am. Pharm. Ass.*, 1929, **28**, 677.
Guilbert (H. R.) et Goss (H.). — *J. Nutr.*, 1932, **5**, 251.
Hansen (L. P.), Cantarow (A.), Rakoff (A. E.) et Paschkis (K. E.). — *Endocr.*, 1943, **33**, 282.
Haslewood (C. A. D.). — *Biochem. J.*, 1947, **41**, 639.
Heintzberger (H. C.). — *Acta. Brevia. Neerland.*, 1943, **13**, 41.
Hersberg (E. B.) et Wolfe (J. K.). — *J. Biol. Chem.*, 1940, **133**, 667.
Hu (C. K.) et Frazier (C. N.). — *Proc. Soc. Biol.*, 1935, **33**, 326.
Ikei (R.). — *Fol. Endocr.*, 1931, **6**, 104.
Jayle (M. F.), Crépy (O.) et Judas (O.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, **25**, 301.
Jayle (M. F.), Crépy (O.), Libert (O.), Vandel (S.) et Judas (O.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946, **28**, 363.
Jayle (M. F.) et Libert (O.). — *Ann. Biol. Clin.*, 1947, **5**, 93.
Jongh (S. E. de), Kober (S.) et Laqueur (E.). — *Biochem. Z.*, 1931, **240**, 247.
Juhn (M.) et Gustavson (R. G.). — *Anat. Rec.*, 1929, **44**, 204.
Juhn (M.) et Gustavson (R. G.). — *Proc. Soc. Biol.*, 1930, **27**, 747.
Kahnt (L. C.) et Doisy (E. A.). — *Endocr.*, 1928, **12**, 760.
Kleiner (I.). — *J. of Biol. Chem.*, 1941, **138**, 783.
Kober (S.). — *Biochem. Z.*, 1931, **239**, 209.
Kober (S.). — *Acta. Brev. Neerl. Physiol.*, 1933, **3**, 113.
Kober (S.). — *Bioch. J.*, 1938, **32**, 357.
Kostich (S.) et Télébakovitch (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **100**, 51.
Laqueur (E.), Hart (P. C.) et Jongh (S. E. de). — *Dtsch. Med. Woch.*, 1927, **53**, 1583.
Laqueur (E.) et Jongh (S. E. de). — *J. Pharm. Exper. Ther.*, 1929, **36**, 1.

LIPSCHUTZ (A.) et coll. — *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **94**, 976.
LŒWE (S.) et VOSS (H. E.). — *Endokr.*, 1929, **3**, 343.
MARRIAN (G. F.). — *Chem. Ind.*, 1930, **49**, 237.
MARRIAN (G. F.) et PARKES (A. S.). — *J. Physiol.*, 1929, **67**, 389.
MARRIAN (G. F.). — *Nature*, 1930, **125**, 90.
MARRIAN (G. F.). — *Physiol. Rev.*, 1933, **13**, 185.
MARRIAN (G. F.). — *Bull. New-York Acad. Med.*, 1939, **15**, 27.
MARRIAN (G. F.). — *J. Endocr.*, 1948, **5**, 71.
MASQUELIER (J.) et JAUBERT (J. L.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 77.
MATHER (A.). — *J. Biol. Chem.*, 1942, **144**, 617.
MAYER (Ch.). — *Bruxelles Med.*, 1946, **26**, 1181.
MORICARD (M^me^ F.). — Hormonologie sexuelle humaine. Masson, 1943.
NAKAMURA (M.). — *Trans. Jap. Path.*, 1929, **19**, 85.
NESTORESCU (B.) et CIUREA (C.). — *Bull. Acad. Med. Roumanie*, 1946, n° 4.
ORBAN (F.) et WATRIN (M.). — A. Biol., 1929, **39**, 271.
PALLOT (G.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 1333.
PARKES (A. S.) et BRAMBELL (F. W. R.). — *J. Physiol.*, 1928, **64**, 388.
PARKES (A. S.), FIELDING (V.) et BRAMBELL (F. W. R.). — *Proc. Roy. Soc.*, 1932, **109**, 425.
PETIT (G.). — *Bull. de la Soc. Chim. de France*, 1948, 141.
PINCUS (G.). — *Endocr.*, 1943, **32**, 176.
PINCUS (G.). — *J. Clin. Endocr.*, 1945, **5**, 291.
PINCUS (G.) et ZAHL (P. A.). — *J. Gen. Physiol.*, 1937, **20**, 879.
PINCUS (G.), WHEELER (G.), YOUNG (G.) et ZAHL (P. A.). — *J. Biol. Chem.*, 1936, **116**, 253.
PINCUS (G.) et PEARLMAN (W. H.). — 1942, **31**, 507.
SALA (S. L.). — *Rev. Sud-Am. Endocrinol.*, 1935, **18**, 325.
SCHMULOWITZ (M. C.) et WYLIE (H. B.). — *J. Lab. and Clin. Med.*, 1935-1936, **21**, 210.
SCHMULOWITZ (M. C.) et WYLIE (H. B.). — *J. Biol. Chem.*, 1936, **116**, 415.
SCHŒLLER (W.), DOHRN (M.) et HOHLWEG (W.). — *Klin. Woch.*, 1935, **14**, 826.
SMITH (G. V. S.) et SMITH (O. W.). — *Am. J. Physiol.*, 1935, **112**, 340.
SMITH (G. V. S.) et SMITH (O. W.). — *Am. J. Obst. Anal. Gynec.*, 1938, **36**, 769.
SMITH (G. V. S.), SMITH (O. W.) et PINCUS (G.). — *Am. J. Physiol.*, 1938, **121**, 98.
SMITH (G. V. S.), SMITH (O. W.) et SCHILLER (S.). — *Endocr.*, 1939, **25**, 509.
SMITH (G. V. S.), SMITH (O. W.) et GEORGE (V. S.). — *Endocrin.*, 1941, **28**, 740.
SPASOWICZ (Th.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **111**, 105.
STEVENSON (M. F.) et MARRIAN (G. F.). — *Bioch. J.*, 1947, **41**, 507.

Stimmel (B. F. A.). — *J. Biol. Chem.*, 1944, **153**, 327.
Stimmel (B. F. A.). — *J. Biol. Chem.*, 1946, **162**, 99.
Stimmel (B. F. A.). — *J. Biol. Chem.*, 1946, **165**, 73.
Sulman (F.). — *Nature*, 1948, **161**, 605.
Sutherland (E. S.) et Marrian (G. F.). — *Biochem. J.*, 1947, **41**, n° 2.
Szego (C. M.) et Samuel (L. T.). — *Proc. Roy. Soc.*, 1940, **43**, 263.
Szego (C. M.) et Samuel (L. T.). — *J. Biol. Chem.*, 1943, **151**, 587.
Talbot (N. B.), Berman (R. A.), Mac Lachlan (E. A.). — *J. Biol. Chem.*, 1942, **143**, 211.
Talbot (N. B.), Wolfe (J. K.), Mac Lachlan (E. A.), Karush (F.) et Butler (A. M.). — *J. Biol. Chem.*, 1940, **134**, 319.
Varangot (J.). — Hormonothérapie gynécologique. 1 vol., 1946, Masson, édit., p. 73.
Veitch (F. P.) et Milone (N. S.). — *J. Biol. Chem.*, 1945, **157**, 417.
Venning (E.), Evelyn (K. A.) et Harkness (E. V.). — *Trans Roy. Soc. Canada*, 1936.
Venning (E.), Evelyn (K. A.), Harkness (E. V.) et Browne (J. S. L.). — *J. Biol. Chem.*, 1937, **120**, 225.
Venning (E.), Hoffman (M. M.) et Brown (J. S. L.). — *J. Biol. Chem.*, 1942, **146**, 369.
Wade (N. J.) et Doisy (E. A.). — *Proc. Soc. Biol.*, 1934-1935, **32**, 707.
Westerweld (W. W.), Thayer (S. A.), Mac Corquodale (D. W.) et Doisy (E. A.). — *J. Biol. Chem.*, 1938, **126**, 181.
Wieland (H.), Straub (W.) et Dorfmuller (T.). — *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1929, **186**, 97.
Wilson (H.) et Carter (P.). — *Endocr.*, 1947, **41**, 417.
Zimmerman (Z.). — *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1935, **233**, 257.
Zimmerman (Z.). — *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1936, **245**, 47.
Zondek (B.). — *Nature*, 1934, **133**, 209.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

Introduction 1

Chapitre premier. — Les réactions colorées considérées comme spécifiques 9

Technique de Kober 9

Réaction de Bachman 12

Réaction de Pincus 17

Réaction au chlorure de benzoyle 19

Réaction à l'acide gaïacol-sulfonique 19

Recherches personnelles 19

Remarques 25

Chapitre II. — Les réactions colorées non spécifiques 27

Réaction de Zimmerman 27

Réaction de diazotation 30

Réactif T de Girard et Sandulesco 32

Réaction de Folin et Denis 32

Conclusions 33

Chapitre III. — L'extraction des œstrogènes de l'urine 34

Coefficients de partage entre deux solvants non miscibles. 35

Coefficients de partage entre des solvants non miscibles. 37

Solubilité de quelques œstrogènes 39

Hydrolyse 42

Extraction 44

Purification 46

Conclusion 51

Conclusions générales 53

Bibliographie 57

Bordeaux. — Imp. E. Drouillard, place de la Victoire, 3.